

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

ELEMENTOS DE RESISTENCIA A LOS
ANTIBIÓTICOS CODIFICADOS EN EL
CROMOSOMA DE

Stenotrophomonas maltophilia

TESIS DOCTORAL

ÁLVARO HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ
Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)
Madrid, 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

ELEMENTOS DE RESISTENCIA A LOS
ANTIBIÓTICOS CODIFICADOS EN EL
CROMOSOMA DE
Stenotrophomonas maltophilia

Memoria presentada para optar al grado de doctor por:

Álvaro Hernández Fernández

Director: Dr. José Luis Martínez Menéndez

Tutor: Dr. Fernando Rojo de Castro

A mi familia. A Menchu.

*Si hay un hombre que tiene
el corazón de viento,
llenádselo de piedras
y hundidle la rodilla sobre el pecho.
Y si se arranca a volar, gritadle a voces
su culpa: ¡que recuerde!*

Fragmento de la canción de Extremoduro
"Te juzgarán solo por tus errores"
basada en el libro de poemas de
Marcos Ana "Las soledades del muro".

Agradecimientos

Al Dr. José Luis Martínez por haberme dado la oportunidad de hacer esta tesis, por su rapidez en corregirla y por su sentido práctico de la ciencia.

Al Dr. Fernando Rojo, por haber aceptado ser tutor en la tesis, sus ideas en los ensayos con SmeT y los cuadros que nunca pintamos.

Al Dr. Antonio Romero, a Chus Maté y a Federico Martín por todo el trabajo con las estructuras.

Al Dr. Paco Silva por su paciencia al tener que redactar para mí auténticos manuales de cómo trabajar en el ensamblaje y anotación de genomas.

Al Dr. Florencio Pazos y a Aldo Segura por los ensayos de *docking*

A mis compañeros de los laboratorios 212 y 216:

A Alicia que me ayudó al llegar aquí y me ha salvado en este mundo del papeleo para la tesis. Espero que algún día resuelvas tu dudas sobre los actores... A Ana que aprendió atenta el secreto del footprint y me enseñó la purificación con inteínas. A Renata que me ha ayudado con la radiactividad y las proteínas y me dejó claro desde el primer día que los 2 juntos no íbamos a pasar por el torno a la cámara oscura. A Luis y sus amigos Alberto y Rodrigo que hacen juntos un fantástico trío. A Alejandro que me enseñó el chorreo y a lavarme las manos con decon. A Gracia, que me enseñó lo que hay que hacer cuando a las 8 de la tarde golpeas con el codo un cristal lleno de radioactividad y se hace añicos en el suelo. A Álvaro Viñas por las discusiones sobre predecir el represor a partir del operador y porque me da pena que no tenga amigos. A Laura Martínez Sister, máster del manejo de muestras de pacientes con EPOC y siempre hábil con los parecidos de los Simpsons. A Jorge que llegó bailando ricachá y juntos inventamos los MDR que bombardearían drogas al interior de vesículas (una pena que ya se sabía hacer hace 40 años). A Leo que me integró al mundo del cubaneo (que cubaneo integrona tu mi). A Pilar que me enseñó sus RT-PCR fosforitas y matemáticas. A Carolina y su amiga Σοφία Μαργαρίτα Βικτωρία Φρειδερίκη, las 2 reinas de *Pseudomonas*. A Emma, la única mujer que conoce el secreto de los hombres y el de las cianobacterias. A Fernando Corona, que haciendo conmigo los retardos se hizo inmune a la picadura de la cobra G. (o casi inmune).

A Ricardo, Guillermo, Peyman y a Ángel (que con su trabajo ha acelerado el mío). A Flor, Vicky y Paula que me ayudaron con uniones proteínas-DNA y a Paolo que me dio ideas (malas) para distribuir las cargas. A Alex y a Alexandro por el Tecan. Tengo que agradecer a Blanca Sánchez que calculara las CMI con SmQnr.

Tack Lars Backman och mina vänner i Umeå: Jose, Jocke , Anki, Peter, Linus, Mantas, Vladimir, Lena och Mani, som lärde mig mycket av det jag behövde för att göra denna avhandling och gjorde mitt liv i Sverige mycket bättre. Entre los 2 mundos a Marisa y a Arsenio con quienes contacté al llegar a Umeå y Madrid. A Maribel, por ser como Tamara y no cambiar nunca.

A mis padres (Ricardo y Mari Carmen), a mis hermanos (María, Almudena, Ricardo, Inés, Félix, Laura y Nieves), y a Julia que aguantaron mi infancia con un casa llena de bichos. A mis cuñados/as y mis sobrinos/as.

A Menchu, aunque no me deje tener bichos en casa.

ÍNDICE

SUMMARY.....	15
TABLA DE ACRÓNIMOS.....	17
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	21
1.1.1. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS POR TRANSPORTADORES MDR	22
1.1.2. REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES MDR	25
1.1.3. RESISTENCIA A QUINOLONAS	28
1.1.3.1. PROTEÍNAS Qnr CODIFICADAS EN PLÁSMIDOS	29
1.1.3.2. PROTEÍNAS Qnr CODIFICADAS EN CROMOSOMAS	30
1.2. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	31
1.2.1. RESISTENCIA INTRÍNSECA A ANTIBIÓTICOS EN <i>S. maltophilia</i>	32
1.2.2. EL SISTEMA SmeDEF DE <i>S. maltophilia</i>	32
1.2.3. EL REPRESOR TRANSCRIPCIONAL SmeT	34
1.2.4. OTRAS BOMBAS RND EN <i>S. maltophilia</i>	34
2. OBJETIVOS.....	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS	43
3.2. TABLA DE OLIGONUCLEÓTIDOS	44
3.3. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	46
3.3.1. MEDIOS Y CONDICIONES GENERALES.....	46
3.3.2. ESTUDIOS DE ANTAGONISMO ENTRE BIOCIDAS Y CIPROFLOXACINA	46
3.3.3. ESTUDIOS DE ANTAGONISMO ENTRE EXUDADOS DE PLANTAS Y CIPROFLOXACINA	46
3.3.4. CURVAS DE CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE TRICLOSÁN Y ANTIBIÓTICOS.....	46
3.3.5. SELECCIÓN DE MUTANTES DE <i>S. maltophilia</i> EN CLORURO DE BENZALCONIO Y HEXACLOROFENO	47
3.3.6. DETERMINACIÓN DE CMIs DE MUTANTES EN HEXACLOROFENO Y CLORURO DE BENZALCONIO	47
3.3.7. CURVAS DE CRECIMIENTO DE MUTANTES DE <i>S. maltophilia</i> SELECCIONADOS EN CONCENTRACIONES INHIBITORIAS DE CLORURO DE BENZALCONIO Y HEXACLOROFENO.	48
3.4. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS	48
3.4.1. ENSAMBLAJE DEL GENOMA DE <i>S. maltophilia</i> D457.....	48
3.4.2. PREDICCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA PROTEÍNA SmeT	48
3.4.3. DOCKING DE EFECTORES EN LA ESTRUCTURA DE SmeT	49

3.4.4.	BÚSQUEDA DE UN GEN qnr EN EL GENOMA DE <i>S. maltophilia</i>	49
3.4.5.	BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS Qnr EN GENOMAS Y METAGENOMAS AMBIENTALES	49
3.4.6.	ALINEAMIENTOS Y ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LAS PROTEÍNAS Qnr	50
3.4.7.	ANÁLISIS DEL ENTORNO GÉNICO DE LAS PROTEÍNAS Qnr CROMOSÓMICAS	50
3.4.8.	PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE SmQnr	51
3.5.	TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ADN	51
3.5.1.	CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO QUE EXPRESA LA PROTEÍNA RECOMBINANTE CBD-Intein-SmeT	51
3.5.2.	OBTENCIÓN DE SONDAS RADIOACTIVAS PARA LOS ENSAYOS DE UNIÓN SmeT-ADN	52
3.5.2.1.	MARCAJE RADIOACTIVO DE LA ZONA INTERGÉNICA <i>smeD-smeT</i> PARA LOS ENSAYOS DE FOOTPRINTING Y NUCLEÓSIDO PERDIDO	52
3.5.2.2.	OBTENCIÓN DE UNA SONDA RADIOACTIVA DE 158 pb PARA LOS ENSAYOS DE NUCLEÓSIDO PERDIDO	52
3.5.2.3.	MARCAJE RADIOACTIVO DEL OPERADOR DE SmeT	52
3.5.3.	IDENTIFICACIÓN Y CLONACIÓN EN <i>E. coli</i> DEL GEN <i>Smqnr</i> DEL CROMOSOMA DE <i>S. maltophilia</i>	53
3.6.	TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ARN	53
3.6.1.	EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL	53
3.6.2.	TRATAMIENTOS CON ADNasa I Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN TOTAL	54
3.6.3.	RETROTRANSCRIPCIÓN, DISEÑO DE CEBADORES Y RT-PCR	54
3.7.	TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	54
3.7.1.	EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SmeT	54
3.7.2.	ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	55
3.7.3.	WESTERN BLOTTING DE SmeT	55
3.7.4.	CRISTALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE SmeT	56
3.8.	ENSAYOS DE RETARDO EN GEL (EMSA)	56
3.9.	IMPORTANCIA DE LOS NUCLEÓTIDOS DISTALES DEL OPERADOR ...	56
3.10.	ENSAYOS DE RETARDO EN GEL (EMSA) CON EFECTORES	57
3.11.	ENSAYOS DE FOOTPRINTING CON ADNasa I	57
3.12.	ENSAYOS DE NUCLEÓSIDO PERDIDO	58
4.	RESULTADOS	61
4.1.	SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE <i>S. maltophilia</i> D457	61
4.2.	LA PROTEÍNA SmQnr	64
4.2.1.	IDENTIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA Qnr-LIKE CODIFICADA EN EL CROMOSOMA DE <i>S. maltophilia</i>	64
4.2.2.	LA PROTEÍNA SmQnr DE <i>S. maltophilia</i> D457 DISMINUYE LA SENSIBILIDAD A QUINOLONAS EN EL HOSPEDADOR HETERÓLOGO <i>E. coli</i> ..	65

4.2.3. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE GENES <i>qnr</i> EN CROMOSOMAS BACTERIANOS	66
4.2.4. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE GENES <i>qnr</i> EN METAGENOMAS AMBIENTALES	72
4.2.5. PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE SmQnr.....	72
4.3. ANALISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE SmeT	75
4.3.1. CLONAJE Y PURIFICACIÓN DE SmeT	75
4.3.2. OLIGOMERIZACIÓN DE SmeT	76
4.3.3. CRISTALIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE SmeT.....	76
4.3.4. IDENTIFICACIÓN DE LA SECUENCIA OPERADORA DE SmeT.....	78
4.3.5. ESPECIFICIDAD DE LA UNIÓN SmeT-REGIÓN INTERGÉNICA <i>smeD-smeT</i>	79
4.3.6. DETERMINACIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS FUNDAMENTALES PARA UNIÓN DE SmeT	80
4.3.7. IMPORTANCIA DE LOS NUCLEÓTIDOS DISTALES DEL OPERADOR .	81
4.4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL SISTEMA SmeDEF EN RESPUESTA A EFECTORES.....	82
4.4.1. REGULACIÓN DE SmeDEF EN RESPUESTA A ANTIBIÓTICOS.....	82
4.4.2. EXPRESIÓN DE SmeDEF EN RESPUESTA A BIOCIDAS.....	83
4.4.2.1. TRICLOSÁN, HEXACLOROFENO Y CLORURO DE BENZALCONIO ROMPEN LA UNIÓN SmeT-ADN	83
4.4.2.2. AUMENTO DE LOS NIVELES DE ARNm DE <i>smeD</i> EN PRESENCIA DE BIOCIDAS.....	84
4.4.2.3. EFECTO DE LOS BIOCIDAS EN LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS EN <i>S. maltophilia</i>	85
4.4.2.4. CURVAS DE CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE TRICLOSÁN Y ANTIBIÓTICOS EXPULSADOS POR LA BOMBA SmeDEF	87
4.4.2.5. ESTRUCTURA DE SmeT UNIDO A TRICLOSÁN.....	88
4.4.3. EXPRESIÓN DE SmeDEF EN RESPUESTA A EXUDADOS DE PLANTAS Y ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO	89
4.4.3.1. ALGUNOS EXUDADOS DE PLANTAS ROMPEN LA UNIÓN SmeT-ADN	89
4.4.3.2. AUMENTO DE LOS NIVELES DE ARNm DE <i>smeD</i> EN PRESENCIA DE EXUDADOS DE PLANTAS.....	90
4.4.3.3. EFECTO DE LOS EXUDADOS DE PLANTAS EN LA SENSIBILIDAD DE <i>S. maltophilia</i> A LOS ANTIBIÓTICOS.....	91
4.4.4. DOCKING DE SmeT CON SUS POSIBLES EFECTORES	92
4.5. REGULACIÓN DE OTROS SISTEMAS RND EN <i>S. maltophilia</i> EN RESPUESTA A EFECTORES.....	93
4.6. SELECCIÓN DE CEPAS MULTIRRESISTENTES POR EXPOSICIÓN A LOS BIOCIDAS.....	95
4.6.1. EL BIOCIDA CLORURO DE BENZALCONIO SELECCIONA MUTANTES MULTIRRESISTENTES DE <i>S. maltophilia</i>	95

4.6.2.	<i>FITNESS COST</i> DE LOS MUTANTES RESISTENTES A BIOCIDAS	97
5.	DISCUSIÓN	101
5.1.	LA RESISTENCIA INTRÍNSECA EN <i>S. maltophilia</i>	101
5.2.	SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE <i>S. maltophilia</i> D457	102
5.3.	EL GENOMA DE <i>S. maltophilia</i> CODIFICA UNA NUEVA PROTEÍNA DE RESISTENCIA A QUINOLONAS, SmQnr.	103
5.4.	LA PROTEÍNA SmET REPRIME LA EXPRESIÓN DEL SISTEMA MDR SmDEF AL UNIRSE A SU PROMOTOR	105
5.5.	SmET REGULA LA EXPRESIÓN DE SmDEF EN RESPUESTA A EFECTORES	107
5.6.	NINGUNA DE LAS OTRAS BOMBAS RND IMPLICADAS EN RESISTENCIA INTRÍNSECA A ANTIBIÓTICOS EN <i>S. maltophilia</i> RESPONDE A LOS BIOCIDAS O A LA FLORETINA.	113
5.7.	EL BIOCIDA CLORURO DE BENZALCONIO SELECCIONA MUTANTES RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS	114
6.	CONCLUSIONES	119
7.	BIBLIOGRAFÍA	123
	ANEXO 1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS	135
1.	TABLA DE PORCENTAJE DE IDENTIDAD ENTRE PROTEÍNAS Qnr CROMOSÓMICAS Y Qnr PLASMÍDICAS	135
2.	ABREVIATURAS DE LOS ENTORNOS DE GENES <i>qnr-LIKE</i> CROMOSÓMICOS	138
	ANEXO 2. LISTA DE ARTÍCULOS PUBLICADOS Y MANUSCRITOS	140

SUMMARY

Stenotrophomonas maltophilia is an opportunistic pathogen of growing relevance due to its increasing prevalence in the nosocomial environment. The capability of this organism to colonize different medical devices, such as catheters or breathing tubes, is responsible for the distressing probabilities of acquiring infections caused by this bacterium at hospitals. A typical feature of *S. maltophilia* is its broad antibiotic resistant phenotype (what makes difficult the treatment of the infected patients). This resistance is inherent to the species and has not been acquired by horizontal gene transfer or by mutations. Our data from the first part of this work, focused in the *S. maltophilia* D457 genome sequencing, suggest that the different strains of this microorganism share a large core genome but the elements that allow the bacteria to occupy several habitats are codified in a small accessory genome.

We describe that the *S. maltophilia* chromosome encodes a Qnr protein, SmQnr, that confers resistance to quinolones when is expressed in the heterologous host *Escherichia coli*. A bioinformatic search for *qnr* genes in bacterial genomes and environmental metagenomes has pointed to the sea as the reservoir for the plasmid encoded *qnrB* genes that are causing problems in the clinical environment.

We also report the mechanism that regulates the expression of the most important multidrug efflux pump in this bacterial species, SmeDEF, which is responsible for the expulsion of tetracycline, chloramphenicol, erythromycin and quinolones. Strikingly our results show that none of these antibiotics is capable to induce the expression of the pump. On the contrary, the molecules that act as pump inducers are biocides and secondary metabolites from plants. Based on these results, we propose a model that explains why the susceptibility of *S. maltophilia* to quinolones decreases in presence of triclosan. We also demonstrate that pump expression is triggered by the binding of such molecules to the transcriptional repressor of this system, the protein SmeT. We have published the structure of SmeT and defined the DNA operator that this protein recognizes in the *S. maltophilia* chromosome. The structure of SmeT reveals a dimeric protein that folds forming 9 helices, the first 3 helices at the N-terminal are responsible for the DNA binding, the 2 helices at the C-terminal are the most important for protein dimerization and the central helices conform an effector binding pocket. The protein binds specifically to a 28 bp pseudopalindromic sequence, located in the DNA region where the promoters of the *smeDEF* and *smeT* overlap, and in this way represses simultaneously the transcription of *smeDEF* and *smeT*. We have suggested a stoichiometry ratio for the complex SmeT-DNA (4:1) and also determined that the sequence TGTATGT, in the strand that codifies the pump, is critical for the binding of the protein.

The last part of the work has raised the probability that commonly used biocides might select for antibiotic resistance in *S. maltophilia*. Our data show that this risk exists in the case of triclosan and benzalkonium chloride, but not for the mutants selected by hexachlorophene.

TABLA DE ACRÓNIMOS

BSA: Seroalbúmina bovina.

DTT: Ditioneitol.

CCCP: Carbonil cianida-m-clorofenil hidrazona

DNP: Dinitrofenol.

CMI: Concentración mínima inhibitoria.

EBI: Instituto bioinformático Europeo.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EMSA: Ensayo de cambio en la movilidad en electroforesis.

Gb: Gigabase (1.000.000 de pares de bases)

HGT: Transferencia horizontal de genes.

HTH: Dominio de unión a ADN hélice giro hélice.

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.

LB: Medio de Luria Bertani.

MH: Caldo de Mueller Hinton.

NCBI: Centro nacional de información biotecnológica (EEUU).

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

Pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

PVDF: Difluoruro de polivinilo

RT RT-PCR: PCR en tiempo real de DNA obtenido por transcripción reversa

SDS: Dodecil sulfato sódico.

SEM: Error estándar de la media.

WGS: Genomas completos sin ensamblar.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento y utilización de los agentes antimicrobianos durante el siglo XX redujo la amenaza que suponían las enfermedades infecciosas. Además, el control de enfermedades de distribución mundial que hasta ese momento eran difícilmente tratables contribuyó al aumento de la esperanza de vida (WHO, 2010). Sin embargo, apenas 4 años después de que empezara la producción en masa de la penicilina ya habían aparecido las primeras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a dicho antibiótico (Barber, 1947), y en la década de los 50 se describían las primeras enterobacterias resistentes a múltiples antimicrobianos (Kitamoto, 1956). Desde entonces la cantidad de bacterias resistentes ha ido aumentando a medida que aumentaba el uso de antibióticos.

Hoy en día, la multirresistencia a antibióticos se ha convertido en un serio problema para el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Aleksun and Levy, 2007). La enorme presión selectiva que hay en los hospitales favorece que los determinantes de resistencia se propaguen mediante elementos móviles (Jones et al., 1997). Así, incluso las bacterias sensibles a los antibióticos, causantes de enfermedades cuyo tratamiento era por tanto fácil, van adquiriendo genes de resistencia (Vier et al., 2007) complicando la recuperación, especialmente de pacientes inmunocomprometidos. Otro factor a tener en cuenta es que aunque generalmente está aceptado que la adquisición de resistencia supone un coste para la fisiología bacteriana (Andersson and Levin, 1999) hay ejemplos de que no siempre es así (Gustafsson et al., 2003; Hurdle et al., 2004), por lo que la resistencia puede persistir incluso en ausencia de presión antibiótica. La aparición de las bacterias resistentes no es exclusiva de la clínica sino que el uso/abuso de antibióticos en la industria ganadera y agrícola convierte al medio ambiente en un laboratorio donde las bacterias ensayan su resistencia a los antibióticos (Martinez, 2008).

1.1. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Podemos distinguir dos tipos de resistencia antimicrobiana, la resistencia intrínseca sería aquella que confieren determinantes que están presentes en todos los miembros de una especie. La resistencia adquirida vendría dada tras la adquisición, por mutación o transferencia horizontal, de una modificación o un gen que diera lugar a una disminución de la sensibilidad bacteriana respecto a la cepa parental.

A la resistencia intrínseca contribuyen muchos factores. De hecho, se ha planteado recientemente que una gran variedad de genes, muchos de ellos con una función básica en el metabolismo bacteriano, modulan la resistencia intrínseca de las bacterias (Fajardo et al., 2008). De un modo más específico, en las bacterias Gram negativas la presencia de una doble membrana contribuye de forma fundamental ya que la membrana externa supone una barrera para muchos fármacos (Mett et al., 1988). Aunque muchos antibióticos pueden penetrar a través de porinas algunas de estas proteínas tienen una permeabilidad muy reducida lo que imposibilita el acceso al citosol bacteriano. También contribuye a la resistencia intrínseca de un microorganismo la ausencia de la diana sobre la que tendría que actuar el antibiótico, o del transportador del mismo, y la presencia de enzimas que inactiven o degraden el antibiótico (Walsh et al., 1997). Por último, la concentración intracelular de antibióticos se puede reducir mediante la expulsión de la droga por transportadores transmembrana (Li et al., 1994).

1.1.1. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS POR TRANSPORTADORES MDR

Los sistemas de bombeo múltiple de drogas o sistemas MDR (*Multi**drug Resistance*) son proteínas o complejos proteicos transmembrana capaces de expulsar un amplio rango de sustratos estructuralmente diferentes.

Las primeras referencias a proteínas de membrana implicadas en la resistencia a agentes quimioterapéuticos son de finales de los años 70, cuando un estudio correlacionó la presencia de una glicoproteína de membrana, Glicoproteína-P, con un fenotipo de resistencia pleiotrópica a drogas anfifílicas en células de ovario de hámster (Juliano and Ling, 1976). A pesar de estos resultados, en este trabajo no quedaba claro en que forma la Glicoproteína-P contribuía a tal resistencia. La primera prueba de que determinados transportadores estaban implicados en la expulsión de drogas es de 1980 (McMurry et al., 1980). A partir de lisados de *Escherichia coli* que contenían plásmidos que codificaban determinantes de resistencia a tetraciclina, McMurry et al. obtuvieron liposomas donde la orientación de la membrana era inversa a la normal. De esta forma, recogían en el interior de las vesículas las moléculas que en condiciones normales los transportadores expulsarían al exterior (McMurry et al., 1980). Con este experimento, no solo demostraron que el antibiótico era expulsado sino que pudieron establecer que el transporte era dependiente de energía ya que el contenido en tetraciclina dentro de

los liposomas disminuía al añadir el inhibidor del gradiente de protones DNP (*Dinitrophenol*).

Aunque inicialmente se pensó que estos transportadores tenían su reservorio en bacterias productoras de antibióticos, siendo algo así como un antídoto para su propio veneno (el antibiótico) (Davies, 1994; McMurtry et al., 1980), hoy en día se sabe que este tipo de sistemas de bombeo múltiple de drogas aparecen en todos los seres vivos (arqueas, procariotas y eucariotas), y que en ciertos casos su función original probablemente no sea la expulsión de drogas (Martinez et al., 2009). De hecho los organismos con mayor número de bombas MDR tienen su hábitat en el suelo o asociados a plantas (Konstantinidis and Tiedje, 2004). Además, muchos estudios han demostrado la existencia de transportadores MDR en bacterias lejos del entorno clínico y de la exposición a antibióticos. El aumento exponencial de los genomas bacterianos anotados ha supuesto una nueva herramienta para corroborar la ubiquidad de estos sistemas MDR. Por ejemplo, en el caso del patógeno que se estudia en esta tesis, la publicación en 2008 de los genomas de 2 cepas de *S. maltophilia* obtenidas de biotopos diferentes evidenció que los 13 sistemas MDR que poseen estas bacterias son inherentes a la especie y no se dan como resultado de la presión selectiva por antibióticos que pueda haber recibido la cepa clínica (Crossman et al., 2008; Lucas S., 2008).

En cuanto a la, en un principio supuesta, especificidad transportador-antibiótico diversos estudios han demostrado que estas bombas son capaces de expulsar, además de los antibióticos, compuestos tan diversos como solventes (Duque et al., 2001), colorantes (DeMarco et al., 2007), metales pesados (Nies, 2003), detergentes (Zhang et al., 2001), sales biliares (Buckley et al., 2006), biocidas (Sanchez et al., 2005) o exudados de plantas (Lewis, 2001). Estos últimos, son considerados por algunos autores los sustratos naturales de las bombas ya que en muchos casos moléculas como flavonoides de plantas son los mejores efectores de los sistemas MDR al modular su expresión mediante la unión a sus reguladores globales y específicos (Lewis, 2001; Randall and Woodward, 2002). En este entorno natural, el rol de los sistemas MDR tendría relación con la comunicación entre planta y bacteria y no con la expulsión de drogas (Espinosa-Urgel et al., 2002). También merece una mención especial el papel que ciertos biocidas de uso doméstico como el triclosán, presente en pastas de dientes o jabones, tienen como sustratos de estas bombas. Varios estudios demuestran que la exposición a estos agentes puede seleccionar mutantes en los elementos que controlan la expresión de los sistemas MDR bacterianos con lo que aumenta la resistencia del

microorganismo no solo al biocida sino también a determinados antibióticos (Bailey et al., 2009; Huet et al., 2008; Sanchez et al., 2005).

Los sistemas MDR son capaces de expulsar moléculas desde el citosol, la membrana interna o el periplasma. Actualmente están clasificados en cinco familias (Aleksun and Levy, 2007): ABC (*A*TP *b*inding *c*assette), MATE (*m*ultidrug *a*nd *t*oxic *c*ompound *e*xtrusion), MFS (*m*ajor *f*acilitator *s*uperfamily), RND (*r*esistance *n*odulation *c*ell *d*ivision), y SMR (*s*mall *m*ultidrug *r*esistance). El transporte de sustratos puede ser un transporte activo dependiente de hidrólisis de ATP (familia ABC) o un transporte secundario. En la familia MATE la salida de drogas puede estar acoplada a la entrada de H^+ o de Na^+ , en las familias MFS, RND y SMR la expulsión es siempre un mecanismo de antiporte sustrato/ H^+ (ver Figura 1).

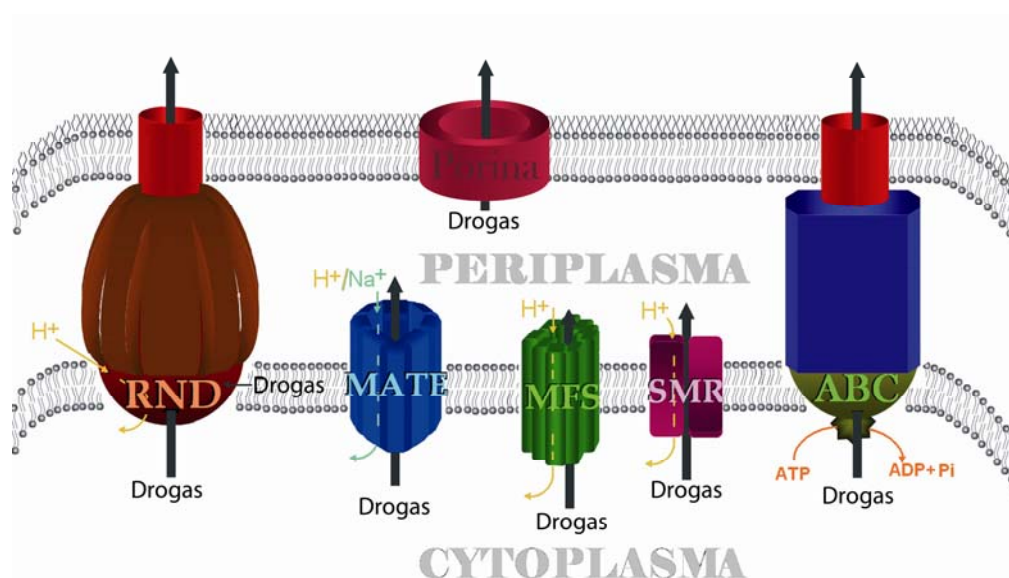


Figura 1. Composición de las 5 familias MDR en bacterias Gram negativas.

En la familia RND la bomba tripartita está formada por un trímero de proteína transportadora (AcrB (Murakami et al., 2006)), un tridecámero de PFM (MexA (Akama et al., 2004)) y un trímero de PME (TolC (Koronakis et al., 2000)). En la familia SMR (EmrE (Ubarretxena-Belandia et al., 2003)) la unidad funcional es un homodímero de 4 hélices por monómero que se orientan opuestamente. En las familias MFS (EmrD (Yin et al., 2006)) y MATE (NorM (Singh et al., 2006)) la bomba es un monómero de 12 hélices. La proteína transportadora en la familia ABC (Sav1866 (Dawson and Locher, 2006)) es un homodímero que delimita dos regiones: una citoplasmática, con el dominio de unión de nucleótidos (NBD), y otra transmembrana (TMD).

En bacterias Gram negativas los miembros de la familia RND son los más relevantes clínicamente (Poole, 2001). Los transportadores RND normalmente se encuentran asociados a una proteína de fusión de membrana (PFM) y una porina de membrana externa (PME). Las 3 proteínas se ensamblan formando un canal,

que atraviesa el periplasma y la membrana externa, por el que se expulsan las moléculas al exterior (Blair and Piddock, 2009). Generalmente, los genes que codifican estas bombas tripartitas se encuentran en un mismo operón. En algunos casos el operón no contiene el gen codificante de la porina del sistema y el ensamblaje de la bomba se completa gracias a una PME codificada en un gen distante.

Para concluir cabe destacar que la conservación a lo largo de la evolución de estos sistemas MDR, así como que todos ellos presenten una regulación precisa (véase 1.1.2) sugiere que estos transportadores juegan un papel fundamental en la fisiología de los seres vivos (Martinez et al., 2009).

1.1.2. REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES MDR

Como ya se ha apuntado anteriormente, la expresión de los transportadores MDR está siempre fuertemente regulada. El control de estas bombas es ejercido por redes complejas que integran tanto reguladores globales (Randall and Woodward, 2002) como específicos (Grkovic et al., 2002). Por ejemplo, en *E. coli* la expresión del sistema AcrAB-TolC es controlada de forma conjunta por el represor local AcrR y por el sistema de regulación global mar (*multiple antibiotic resistance*) (Ma et al., 1996).

En la regulación del regulón mar, tiene un papel destacado un operón llamado *marRAB*, que codifica 3 proteínas; la primera, MarR, es un represor transcripcional que regula la expresión del operón en respuesta a ciertas moléculas, como exudados de plantas (sobre todo salicilato) (Cohen et al., 1993) o antibióticos (ver Figura 2). La desrepresión de MarR inicia la transcripción del activador global MarA y la de la proteína de función desconocida MarB (Randall and Woodward, 2002). MarA, además de activar la expresión de AcrAB-TolC, es capaz de regular la expresión de otros 60 genes (Barbosa and Levy, 2000) implicados en distintos procesos celulares (metabolismo, reparación de ADN, estrés oxidativo,...) mediante su unión a distintos promotores (ver Figura 2). Para aumentar la complejidad de esta regulación, el mismo grupo de promotores que reconoce MarA, incluyendo el suyo propio, es reconocido por otros dos reguladores globales, SoxS y RobA, aunque estas dos proteínas actúan en respuesta a estímulos diferentes de los que desreprimen MarR (Martin et al., 2008). Como consecuencia de esta compleja red de regulación, la expresión de la bomba AcrAB-TolC no es un hecho aislado en respuesta a una señal en concreto sino que obedece a un conjunto de señales que

desencadenan un complicado mecanismo de respuesta en la bacteria que incluye la expresión de la bomba.

El sistema global de regulación MarA/SosR/RobA no es específico de *E. coli* sino que se da en otras enterobacterias (Kunonga et al., 2000; Udani and Levy, 2006). Además, sistemas similares también están presentes en Gram positivos, como MgrA que en *Staphylococcus aureus* controla la expresión de mas de 350 genes (Luong et al., 2006).

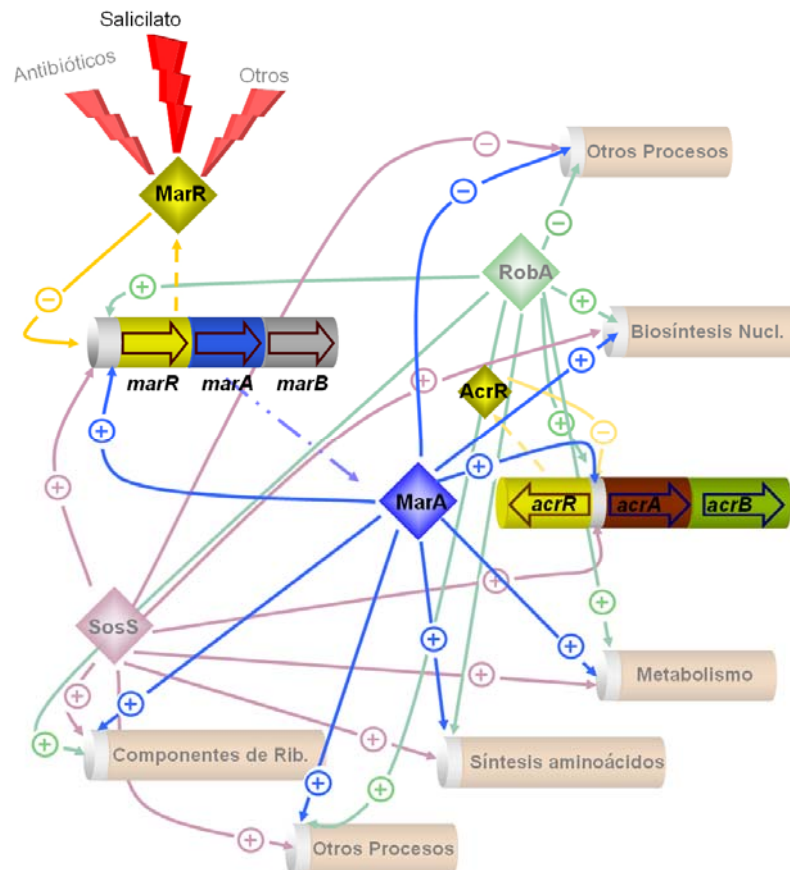


Figura 2. Red de regulación de la expresión de la bomba AcrAB en *E. coli*.

En *E. coli* la expresión del sistema MDR AcrAB-TolC está regulada por un complicado mecanismo al que contribuyen reguladores globales (MarA, SosS, RobA) (Randall and Woodward, 2002) y locales (AcrR) (Ma et al., 1996). El activador global MarA, además de activar la expresión de *acrAB-tolC*, participa, junto con SosS y RobA, en el aumento y disminución de la expresión de mas de 60 genes implicados en procesos diversos como biosíntesis de aminoácidos, componentes de ribosomas, ácidos grasos, nucleótidos y muchos otros (Barbosa and Levy, 2000).

En cuanto a los reguladores específicos (ver Figura 3), que se localizan generalmente delante del operón cuya expresión modulan, podemos encontrar tanto activadores (MexT en *P. aeruginosa* (Kohler et al., 1999)) y represores

transcripcionales (SmeT en *S. maltophilia* (Sanchez et al., 2002)), como sistemas de doble componente (EvgAS en *E. coli* (Eguchi et al., 2003)). En los represores locales es frecuente que la desrepresión de la bomba empiece en respuesta al aumento de la concentración intracelular de ciertas moléculas. Estas moléculas efectoras liberan al regulador de su unión al ADN tras unirse al bolsillo de unión de la proteína (Ramos et al., 2005). En los últimos años se ha descrito que algunos péptidos son capaces de activar la expresión de sistemas MDR usando este mismo mecanismo de unión al bolsillo del represor (Daigle et al., 2007).

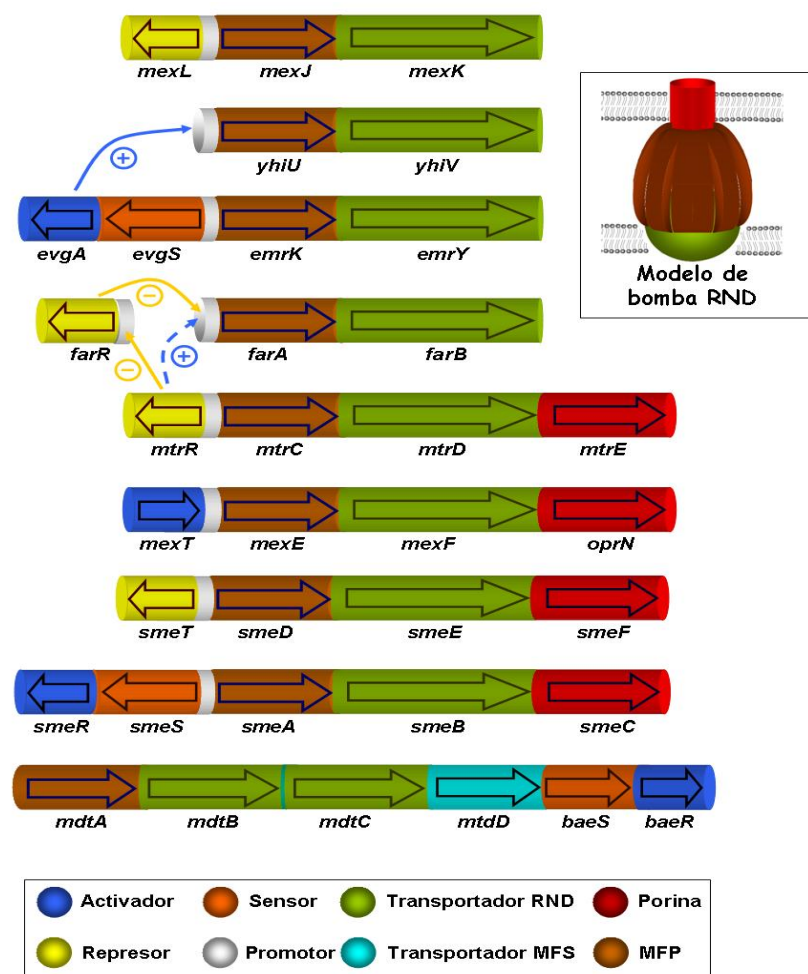


Figura 3. Estructura y regulación específica de los genes de las bombas RND. Las bombas tripartitas de la familia RND suelen estar codificadas en un mismo operón (*smeDEF* (Alonso and Martinez, 2000)). Cuando el gen de la PME no está adyacente, el triplete se completa con el ensamblaje de una porina no contigua (*yhiUV* (Nishino and Yamaguchi, 2002)). Generalmente, delante del operón se encuentran sus genes reguladores (activadores (*mexT* (Kohler et al., 1999)), represores (*mexL* (Chuanchuen et al., 2005)), o sistemas de doble componente (*smeRS* (Li et al., 2002))). Algunos reguladores se encuentran alejados del operón que controlan (*farR* (Lee et al., 2003)) y ejercen su control de forma directa (EvgAS sobre *yhiUV* (Nishino and Yamaguchi, 2002)) o indirecta MtrR sobre *farAB* (Lee et al., 2003)).

Ciertos reguladores específicos son capaces de modular la expresión de bombas distantes. Por ejemplo en *E. coli*, EvgAS controla la expresión de su operón adyacente *emrKY* y también la de la bomba YhiUV mediante la unión a su promotor (Nishino and Yamaguchi, 2002) y en *N. gonorrhoeae*, MtrR controla indirectamente la expresión de FarAB al unirse al promotor del represor FarR (Lee et al., 2003).

La adquisición de un fenotipo multiresistente como consecuencia de la sobreexpresión de los sistemas MDR, suele estar asociado generalmente a la aparición de mutaciones en los reguladores locales de dichas bombas (Smith et al., 2006) y en menor medida, a mutaciones en las secuencias de los operadores que estos reconocen (Cagliero et al., 2007).

1.1.3. RESISTENCIA A QUINOLONAS

Las quinolonas son antibióticos sintéticos de amplio espectro descubiertos en la búsqueda de cloroquinas para tratar la malaria (Deitz et al., 1963). Su actividad antibacteriana se basa en la unión del antibiótico al complejo ADN-Girasa (Shen et al., 1989) o ADN-Topoisomerasa IV con lo que se impide la replicación y la transcripción bacteriana (Tran et al., 2005).

El origen artificial de estos fármacos descartaba, en principio, la idea de que existieran genes de resistencia a quinolonas en la naturaleza y reforzaba la hipótesis de que la disminución de la sensibilidad sería siempre debida a mutaciones en el cromosoma bacteriano (Hooper, 1999). Sin embargo, la aparición en 1998 del primer gen de resistencia a quinolonas codificado en un plásmido, *qnr* (Martinez-Martinez et al., 1998), corroboró estudios anteriores que ya sugerían que en algunas cepas de *E. coli* el incremento de resistencia podría deberse a la adquisición de plásmidos (Gomez-Gomez et al., 1997). Actualmente se considera que las bacterias pueden adquirir resistencia a estos antibióticos por 3 mecanismos; 1) modificaciones en las dianas ADN girasa y/o topoisomerasa IV, 2) mutaciones que conlleven una disminución de la concentración intracelular del antibiótico, ya sea por cambios en la permeabilidad de la membrana o debido a una mayor expulsión del fármaco mediante sistemas MDR (Hooper, 1999), 3) adquisición de un plásmido con un gen que confiera resistencia a quinolonas como *oqxAB* (Hansen et al., 2004) y *qepA* (Yamane et al., 2007) que codifican bombas de expulsión de quinolonas, *aac(6')-Ib-cr* (Robicsek et al., 2006) que codifica una aminoglicósido acetil-transferasa que reduce la actividad de la ciprofloxacina o *qnr* (Martinez-Martinez et al., 1998) que codifica proteínas Qnr (*quinolone resistance*)

que se unen a la girasa (Tran et al., 2005) y a la topoisomerasa IV (Tran et al., 2005) protegiéndolas de la acción del antibiótico de una forma que aún no es bien entendida.

Aunque las mutaciones en la diana dan cuenta de buena parte del fenotipo de resistencia a quinolonas de muchas bacterias, es la combinación de varios de estos mecanismos lo que da lugar a los valores de resistencia más elevados (Llanes et al., 2006).

1.1.3.1. **PROTEÍNAS Qnr CODIFICADAS EN PLÁSMIDOS**

Las proteínas Qnr forman parte de la familia *pentapeptide repeat* (Vetting et al., 2006). Como todos los miembros de esta familia, las proteínas Qnr presentan repeticiones consecutivas de 5 aminoácidos, generalmente A(D/N)LXX, pero con la particularidad de que estos pentapéptidos están distribuidas en 2 dominios, separados generalmente por una glicina seguida de una cisteína. El primer dominio siempre consta de 9 pentapéptidos y el segundo varía entre 22 y 29 (Strahilevitz et al., 2009).

Las proteínas Qnr plasmídicas han sido clasificadas, según su estructura primaria, en 5 grupos; QnrA, QnrB, QnrC, QnrD y QnrS (Strahilevitz et al., 2009).

El primer gen *qnr*, posteriormente renombrado *qnrA1*, fue descubierto en 1998 en un plásmido de una cepa multirresistente de *Klebsiella pneumoniae*. La expresión de este gen en *E. coli* confería a la bacteria un aumento de las CMI de quinolonas de hasta 64 veces. Además, la presencia del plásmido favorecía la adquisición de mutaciones que conferían unos niveles de resistencia al antibiótico aún mayores (Martinez-Martinez et al., 1998). Actualmente hay descritas al menos 8 variantes de QnrA (QnrA1-QnrA8) con identidades de aminoácidos nunca inferiores al 96% lo que sugiere un origen monofilético para estos elementos.

Las proteínas QnrB fueron descritas por primera vez también en *K. pneumoniae* (Jacoby et al., 2006). Existen al menos 23 variantes QnrB (QnrB1-QnrB23) que se encuentran en plásmidos de bacterias como *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter werkmanii*, *Enterobacter cloacae* o la ya citada *K. pneumoniae*. La identidad a nivel de aminoácidos entre las proteínas plasmídicas QnrB es siempre superior al 92%.

De *qnrS* se han descrito 4 variantes, que se encuentran en plásmidos de *Shigella flexneri* (*qnrS1*), *S. enterica* serovar *Anatum* (*qnrS2*), *E. coli* (*qnrS3*) y *Salmonella stanley* (*qnrS4*). Aunque habitualmente solo existe un gen *qnr*

plasmídico por bacteria, en algunas ocasiones *qnrS* coexiste con *qnrA* o *qnrB* pero la coexpresión de ambos no supone un efecto aditivo en valores de CMI (Cattoir et al., 2007b).

En 2009 dos nuevos genes *qnr* hallados en *Proteus mirabilis* (*qnrC1*) y *S. enterica* (*qnrD1*) han dado lugar a 2 nuevas categorías de proteínas Qnr (Strahilevitz et al., 2009).

	QnrA1	QnrB1	QnrC1	QnrD1
QnrB1	43%			
QnrC1	64%	41%		
QnrD1	48%	61%	43%	
QnrS1	59%	44%	59%	32%

Tabla 1. Porcentajes de identidades de aminoácidos entre los grupos de proteínas Qnr plasmídicas.

Datos obtenidos de (Strahilevitz et al., 2009).

Por último, cabe destacar que la adquisición de plásmidos que contienen estos genes *qnr* no suele convertir a la bacteria en resistente desde el punto de vista clínico pero sí facilita la adquisición de mutaciones que incrementan la resistencia hasta alcanzar valores con relevancia clínica (Martinez-Martinez et al., 1998).

1.1.3.2. PROTEÍNAS Qnr CODIFICADAS EN CROMOSOMAS

En 2005 se hallaron los primeros genes *qnr* codificados en un cromosoma bacteriano. Los genes *qnrA3*, *qnrA4* y *qnrA5* de *Shewanella algae* tenían una enorme similitud con el gen plasmídico *qnrA1* (mas del 99% de sus aminoácidos idénticos) lo que posicionó a esta bacteria como organismo origen de los genes *qnrA* plasmídicos (Poirel et al., 2005b).

Proteínas similares a las Qnr codificadas en plásmidos, denominadas proteínas Qnr-like, han sido descritas en genomas de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Muchos de estos genes *qnr* o *qnr-like* codificados en genomas han demostrado que aumentan los valores de CMI a quinolonas cuando se expresan en un hospedador heterólogo *E. coli* (Cattoir et al., 2007a; Poirel et al., 2005a; Shimizu et al., 2008; Velasco et al., 2009). Las proteínas Qnr-like halladas en genomas de

bacterias Gram positivas tienen una menor similitud con las plasmídicas. Por ejemplo, la proteína de tipo Qnr codificada en el genoma de *Enterococcus faecalis* posee solo un 25% de identidad respecto a QnrA o QnrB e incluso menor respecto a QnrS (Arsene and Leclercq, 2007). Entre las bacterias Gram negativas en las que se han encontrado genes *qnrA* o *qnrA-like* en sus cromosomas, cabe destacar las familias *Shewanellaceae* y *Vibrionaceae*. Además de la ya mencionada *S. algae*, varias especies del género *Shewanella* poseen proteínas Qnr que llegan a tener identidades de hasta el 61% con QnrA1 (SwoQnr de *Shewanella woody* o SfrQnr de *Shewanella frigidimarina*). Entre los vibrionales *Photobacterium profundum* y *V. fischeri* presentan en el genoma genes de identidad mayor al 65% con QnrA. Otro miembro de este grupo, *V. splendidus*, ha sido señalado como origen de las proteínas QnrS (Cattoir et al., 2007a). Aunque la proteína VspQnr de *V. splendidus* comparte una identidad del 88% con la plasmídica QnrS2 la similitud entre ambas no tiene porque deberse a que una se haya originado a partir de la otra, como consecuencia de la presión selectiva por antibióticos, sino que podría explicarse por una relación filogenética entre ambas previa al uso de las quinolonas. En cuanto a la presencia de genes *qnrB* en cromosomas, recientemente se ha descrito en *Serratia marcescens* el gen *Smaqnr* cuya proteína tiene una identidad del 80% con QnrB1 (Velasco et al., 2009).

1.2. *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia es un bacilo Gram negativo no fermentador de hábitat ubicuo. Principalmente está asociado a ambientes acuáticos aunque también coloniza suelo, plantas y animales (Romanenko et al., 2008). Su interés clínico radica en que es un patógeno hospitalario emergente y puede producir un amplio espectro de infecciones. En pacientes inmunodeprimidos el tratamiento es muy complicado debido a que esta bacteria presenta altos niveles de resistencia a muchos antibióticos (Ferrara, 2006). Aunque en esta tesis *S. maltophilia* se estudia como modelo de microorganismo intrínsecamente resistente a los antibióticos (Sanchez et al., 2009) llama la atención un dato sobre la resistencia adquirida: España es el país del mundo con mayor índice de cepas resistentes a co-trimoxazol (27%) y tricarcilina-clavulánico (47%) (Looney et al., 2009). Esta resistencia, que se adquiere por *HGT* (transferencia horizontal de genes), convierte a *S. maltophilia* en insensible a los 2 fármacos que eran hasta ahora los únicos efectivos contra esta bacteria.

Además de *S. maltophilia* el género *Stenotrophomonas* incluye otras 7 especies; *Stenotrophomonas nitritireducens*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Stenotrophomonas koreensis*, *Stenotrophomonas chelatiphaga*, *Stenotrophomonas terrae* y *Stenotrophomonas humi*, pero ninguna de ellas tiene relevancia clínica (Ryan et al., 2009).

1.2.1. RESISTENCIA INTRÍNSECA A ANTIBIÓTICOS EN *S. maltophilia*

Como ya se ha indicado anteriormente *S. maltophilia* presenta altos niveles de resistencia intrínseca a los antibióticos. Sin embargo, esta característica no es específica de las cepas clínicas sino que también se da en cepas ambientales. La publicación en 2008 de las secuencias de los genomas de 2 cepas de *S. maltophilia* aisladas en 2 distintos biotopos aclaró algunos aspectos referentes a la multirresistencia intrínseca de este organismo. Tanto la cepa endofítica (Lucas S., 2008), como la cepa clínica K279a (Crossman et al., 2008) contenían gran número de genes, no asociados a elementos móviles, que codificaban determinantes de resistencia a antibióticos y metales pesados. Entre ellos: aminoglicósido fosfotransferasas, aminoglicósido N-acetiltransferasas, estreptomycin y espectinomycin-fosfotransferasas, cloranfenicol acetiltransferasas, beta lactamasas, transportadores MDR (dos de tipo MFS, dos de tipo ABC y nueve RND) y proteínas de resistencia a kasugamicina, cobre, arsénico y mercurio. Todo este arsenal cromosómico de elementos de resistencia junto con una membrana de baja permeabilidad (Mett et al., 1988) son responsables de un fenotipo intrínseco multirresistente que es independiente del medio en el que vive la bacteria.

Particularmente importante es la resistencia que *S. maltophilia* presenta a quinolonas. Al inicio de este trabajo la resistencia a estos antibióticos se atribuía a la baja permeabilidad de la membrana externa (Ba et al., 2004) y a la actividad de sistemas MDR, principalmente SmeDEF (Alonso and Martinez, 2001). Ensayos *in vivo* e *in vitro* habían descartado que, a diferencia de lo que ocurre en otras bacterias Gram negativas, la disminución de susceptibilidad a estos antibióticos se debiera a mutaciones en los genes de topoisomerasas *gyrA*, *gyrB*, *parC* o *parE* (Valdezate et al., 2005; Vila J., 2010). Por tanto, quedaba por determinar que otros elementos contribuían a la resistencia que *S. maltophilia* presenta a quinolonas.

1.2.2. EL SISTEMA SmeDEF DE *S. maltophilia*

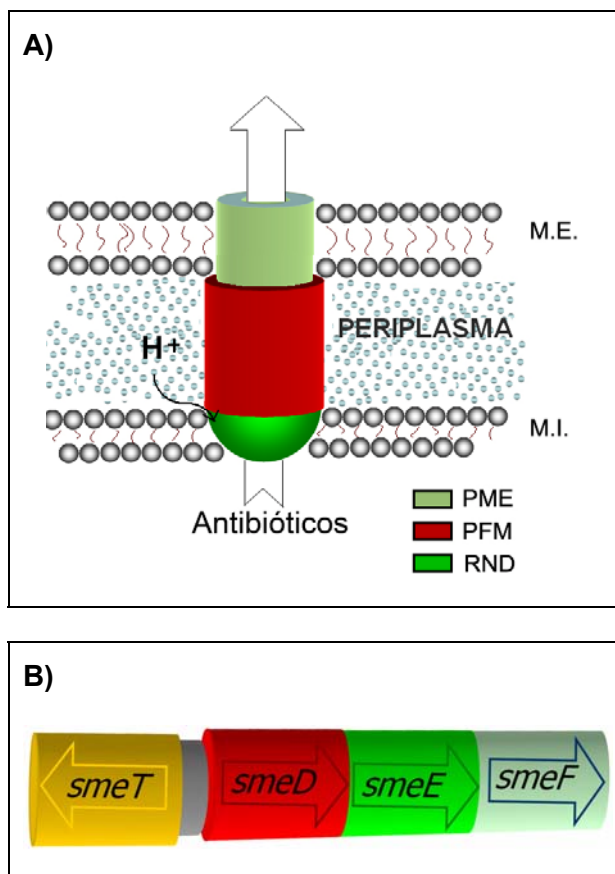
SmeDEF fue el primer sistema MDR identificado y caracterizado en *S. maltophilia* (Alonso and Martinez, 2000). Es una bomba tripartita que sigue el

modelo típico de la familia RND, siendo SmeD la proteína de fusión de membrana, SmeE la proteína RND transportadora y SmeF la porina de membrana externa (ver Figura 4). Las 3 proteínas están codificadas en el operón *smeDEF* cuya expresión está regulada por el represor transcripcional SmeT. El gen *smeT* se localiza delante y en la cadena complementaria del operón. La zona intergénica *smeT-smeD* contiene los promotores de *smeT* y *smeD* (Sanchez et al., 2002).

Figura 4. (A) Modelo de la bomba SmeDEF. (B) El operón *smeDEF*.

SmeDEF es una bomba tripartita de la familia RND formada por una proteína de fusión de membrana (SmeD, en rojo), una proteína RND transportadora (SmeE, en verde oscuro) y una porina de membrana externa (SmeF, en verde claro). Delante del operón *smeDEF*, que codifica las tres proteínas, se encuentra el gen *smeT* que codifica el regulador de la bomba.

M.E.= Membrana externa. M.I.= Membrana interna. PME = Porina de membrana externa. PFM = Proteína de fusión de membranas. RND = Proteína transportadora de la familia RND



En esta tesis se ha trabajado con 2 cepas de *S. maltophilia*: D457 y D457R. La cepa *S. maltophilia* D457R es un mutante espontáneo de D457 que sobreexpresa constitutivamente la bomba SmeDEF debido a una mutación puntual en el gen *smeT*. Esta transversión (de una T a una A) da lugar a un cambio de aminoácido (L166 pasa a ser Q166) responsable de la pérdida de función del regulador (Sanchez et al., 2002). La sobreexpresión de SmeDEF disminuye la sensibilidad de *S. maltophilia* a antibióticos como tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina o quinolonas. Además de antibióticos, otros sustratos de esta bomba MDR son detergentes, colorantes, bromuro de etidio y biocidas como el triclosán (Sanchez et al., 2005; Zhang et al., 2001). El aumento de concentración intracelular de

norfloxacin y bromuro de etidio en presencia del desacoplante del gradiente de protones CCCP demostró que la expulsión de estas moléculas está acoplada a la entrada de protones (Alonso and Martinez, 2000).

1.2.3. EL REPRESOR TRANSCRIPCIONAL *SmeT*

SmeT es un represor transcripcional, con un peso molecular de 24.6 kDa, que pertenece a la familia TetR (*tetracycline repressor*) de reguladores transcripcionales (Sanchez et al., 2002). Esta familia agrupa reguladores transcripcionales con pesos moleculares entre 21 y 25 kDa que forman homodímeros y controlan el nivel de susceptibilidad a antibióticos hidrofóbicos y detergentes al regular la transcripción de sistemas MDR en bacterias (Ramos et al., 2005).

Se ha resuelto la estructura de algunos miembros de esta familia unidos a diversos efectores y se ha descrito que estas proteínas se pliegan formando 9 (QacR en *Staphylococcus aureus* (Murray et al., 2004)) o 10 α -hélices (TetR en *E. coli* (Orth et al., 2000)). Dos de las tres hélices del extremo N-terminal forman un dominio HTH (*helix-turn-helix*) que permite la unión a ADN y las hélices centrales y del extremo C-terminal forman el bolsillo de unión al efector y el dominio de dimerización, respectivamente. También se ha descrito la estequiometría de unión de estos reguladores al ADN. Así, en el caso de proteínas como TetR (Hillen and Berens, 1994) la relación proteína-ADN operador es de 2:1, para QacR (Schumacher et al., 2002), TtgR (Duque et al., 2001) e IcaR (Jeng et al., 2008) es de 4:1 y en el caso de EthR (Engohang-Ndong et al., 2004) es de 8:1.

El mecanismo de acción de algunos de estos represores es conocido. En QacR (Schumacher and Brennan, 2002), la unión del efector al bolsillo de la proteína provoca una elongación de la hélice $\alpha 5$ que descoloca $\alpha 6$ y obliga a una rotación del dominio HTH. La proteína represora pierde su capacidad de unión a ADN y se desprende, lo que posibilita el comienzo de la transcripción de la bomba.

1.2.4. OTRAS BOMBAS RND EN *S. maltophilia*

Al inicio de esta tesis solo se conocían 2 bombas de la familia RND en *S. maltophilia*, la ya mencionada *SmeDEF* y *SmeABC*. El papel de *SmeABC* como bomba tripartita era controvertido ya que la delección del transportador *SmeB* no variaba los valores de CMI. Sin embargo la eliminación de la porina *SmeC* sí se correlacionaba con una menor resistencia. Además, delante de *smeC* aparecía una

zona promotora que permitía la expresión de la porina independientemente del resto de la bomba. La explicación mas probable de cómo SmeC contribuye a la resistencia intrínseca en *S. maltophilia* es que la porina, al igual que TolC en *E. coli* (Koronakis et al., 2000), se acople a otro sistema MDR para expulsar los antibióticos (Li et al., 2002).

Junto con la publicación del genoma de la cepa clínica *S. maltophilia* K279a, Crossman et al. demostraron que al menos otras 2 bombas tripartitas están implicadas en la resistencia intrínseca a antibióticos mediada por bombas RND en esta bacteria. SmeJKL, un homólogo de MtdBC en *E. coli* (Baranova and Nikaido, 2002), sería responsable de la resistencia de bajo nivel a gentamicina, amikacina, tetraciclina, minociclina y ciprofloxacina, y el funcionamiento de SmeYZ conferiría altos niveles de CMI para aminoglicósidos (Crossman et al., 2008).

A lo largo de la Introducción se ha descrito la contribución que determinadas proteínas codificadas en el cromosoma de *S. maltophilia* tienen en el fenotipo multirresistente que presenta esta especie. Sin embargo, al inicio de esta Tesis se desconocía si el genoma accesorio de esta bacteria dependía del nicho que ocupase, tampoco se conocían aspectos tales como cuales son las moléculas que provocan la desrepresión de la bomba MDR más importante (SmeDEF) en este microorganismo o cuales son las bases moleculares de esta regulación. Los factores descritos como determinantes de la resistencia a quinolonas (baja permeabilidad de la membrana y expulsión por bombas MDR) tampoco justificaban los niveles de resistencia que presenta esta bacteria. Por último, aunque se sabía que el biocida triclosán seleccionaba mutantes de *S. maltophilia* con resistencia cruzada a antibióticos como consecuencia de la desrepresión de SmeDEF (Sanchez et al., 2005), se desconocía si esto podía suceder en el caso de otros biocidas. Para analizar estos problemas, nos planteamos los objetivos que se detallan en siguiente apartado.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- 1- Secuenciación del genoma de *Stenotrophomonas maltophilia* D457.
- 2- Búsqueda de genes tipo *qnr* que pudieran contribuir a la resistencia a quinolonas de *S. maltophilia*.
- 3- Análisis de la distribución de las proteínas Qnr codificadas en cromosomas bacterianos y metagenomas ambientales.
- 4- Estudio de las bases moleculares de la regulación del sistema MDR SmeDEF por el regulador transcripcional SmeT en *S. maltophilia*.
- 5- Estudio de la regulación de la expresión de SmeDEF por efectores de SmeT.
- 6- Estudio predictivo de la capacidad de los biocidas para seleccionar mutantes resistentes a los antibióticos en *S. maltophilia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 2.

Cepa o plásmido	Descripción	Referencia o fuente
Cepa		
<i>E. coli</i>		
ER2566	F– λ – <i>fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11 $\Delta(mcrC-mrr)114::IS10$ R(mcr-73::miniTn10–TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]</i> .	New England Biolabs (NEB)(Chong et al., 1998)
TG1	<i>supE thi-1 $\Delta(lac-proAB)$ $\Delta(mcrB-hsdSM)5$ ($r_K^- m_K^-$) [F' <i>traD36 proAB lacIqZΔM15</i>]</i> .	(Sambrook, 2001)
<i>S. maltophilia</i>		
D457	Aspirado Bronquial.	(Alonso and Martinez, 1997)
D457R	Mutante multirresistente espontáneo de la cepa D457 que sobreexpresa el sistema SmeDEF.	(Alonso and Martinez, 1997)
Plásmidos		
pPS6	Plásmido derivado de pQE31 que lleva el gen <i>smeT</i> entre los sitios de restricción <i>KpnI</i> y <i>PstI</i> .	(Sanchez et al., 2002)
pTYB1	Vector de clonación y expresión usado para fusionar el C-terminal de la proteína de interés a una cola de inteína.	NEB (Chong et al., 1997; Chong et al., 1998)
pAH1	Plásmido derivado de pTYB1 usado para expresar <i>smeT</i> unido a inteína.	Este estudio
pAH2	Plásmido derivado de pGEMT-Easy que contiene la región intergénica <i>smeD-SmeT</i> .	(Sanchez et al., 2002)
pAHq	Plásmido derivado de pGEMT-Easy que contiene el gen <i>Smqnr</i> .	Este estudio

Tabla 2. Cepas y plásmidos usados en este estudio.

3.2. TABLA DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos usados en esta tesis se describen en la Tabla 3.

Oligonucleótidos	Función	Secuencia 5'→3'
Intein Reverse	Junto a T7 Universal Primer amplifica el inserto dentro del plásmido pTYB1.	ACC CAT GAC CTT ATT ACC AAC CTC
M13 reverse	Junto a M13 forward se usó para la secuenciación del inserto de <i>Smqnr</i> en pGEM-T.	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA
M13 forward	Junto a M13 reverse se usó para la secuenciación del inserto de <i>Smqnr</i> en pGEM-T.	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC
Op30C(-)	Hibrida con Op30C(+) formando la sonda de doble cadena de 30 pb denominada Sonda Central que incluye los 28 pb del operador de <i>SmeT</i> con un nucleótido extra en cada extremo.	ATA TAC ATA CAT GCT TGT TTG TTT GTA AAC
Op30C(+)	Hibrida con Op30C(-) formando la sonda de doble cadena de 30 pb denominada Sonda Central que incluye los 28 pb del operador de <i>SmeT</i> con un nucleótido extra en cada extremo.	GTT TAC AAA CAA ACA AGC ATG TAT GTA TAT
Op30L(-)	Hibrida con Op30L(+) formando la sonda de doble cadena de 30 pb denominada Sonda Izquierda que incluye los 21 nucleótidos del operador de <i>SmeT</i> mas próximos al inicio de transcripción de <i>smeT</i> y los 9 siguientes.	ACA TGC TTG TTT GTT TGT AAA CCG GTA CAA
Op30L(+)	Hibrida con Op30L(-) formando la sonda de doble cadena de 30 pb denominada Sonda Izquierda.	TTG TAC CGG TTT ACA AAC AAA CAA GCA TGT
Op30R(-)	Hibrida con Op30R(+) formando la Sonda Izquierda que incluye los 21 nucleótidos del operador de <i>SmeT</i> mas próximos al inicio de transcripción de <i>smeD</i> y los 9 siguientes.	GTG CGA AAT ATA CAT ACA TGC TTG TTT GTT
Op30R(+)	Hibrida con Op30R(-) formando la Sonda Izquierda.	AAC AAA CAA GCA TGT ATG TAT ATT TCG CAC
QnrM(+)	Junto a QnrM(-) amplifica un fragmento de 660 pb que incluye desde el primer ATG de <i>Smqnr</i> hasta el codón TGA del final de la proteína	TGA TGC CTA CGG CAC CAC
QnrM(-)	Junto a QnrM(+) amplifica un	CTT GGC ATG GAA TCC CTG AT

	fragmento de 660 pb que incluye desde el primer ATG de <i>Smqnr</i> hasta el codón TGA del final de la proteína.	
RT-gyrA(-)	Junto a RT-gyrA(+) amplifica un fragmento de 60 pb del gen <i>gyrA</i> .	GCC TCG GTG TAT CGC ATT G
RT-gyrA(+)	Junto a RT-gyrA(-) amplifica un fragmento de 60 pb del gen <i>gyrA</i> .	CCA GGG TAA CTT CGG TTC GA
RT-smeC(-)	Junto a RT-smeC(+) amplifica un fragmento de 93 pb del gen <i>smeC</i> .	CAGGGCATCGGCCACTT
RT-smeC(+)	Junto a RT-smeC(-) amplifica un fragmento de 93 pb del gen <i>smeC</i> .	TCA CTG GAT GCC TCG AAG ATT
RT-smeD(-)	Junto a RT-smeD(+) amplifica un fragmento de 76 pb del gen <i>smeD</i> .	TCA ACG CTG ACT TCG GAG AAC T
RT-smeD(+)	Junto a RT-smeD(-) amplifica un fragmento de 76 pb del gen <i>smeD</i> .	CGG TCA GCA TCC TGA TGG A
RT-smeJ(-)	Junto a RT-smeJ(+) amplifica un fragmento de 96 pb del gen <i>smeJ</i> .	CGC TTT CGT ACT GTG CCA CTT
RT-smeJ(+)	Junto a RT-smeJ(-) amplifica un fragmento de 96 pb del gen <i>smeJ</i> .	TCG AAC GCG CCT GAG TAT C
RT-smeT(-)	Junto a RT-smeT(+) amplifica un fragmento de 75 pb del gen <i>smeT</i> .	GCC TGG GTG TCC TCT TTG GT
RT-smeT(+)	Junto a RT-smeT(-) amplifica un fragmento de 75 pb del gen <i>smeT</i> .	GGT ACA ATT CAG CCA CGT TTC A
RT-smeY(-)	Junto a RT-smeY(+) amplifica un fragmento de 65 pb del gen <i>smeY</i> .	CAC CAG GAT GCG CAG GAT
RT-smeY(+)	Junto a RT-smeY(-) amplifica un fragmento de 65 pb del gen <i>smeY</i> .	AGC TGC TGT TCT CCG GTA TCA
sme46	Junto a sme47 amplifica una zona de 223 pb que contiene el operador de <i>SmeT</i> .	GGG TGT GGG TAC GAG TGC
sme47	Junto a sme46 amplifica una zona de 223 pb que contiene el operador de <i>SmeT</i> .	GAC GGA AAG GCT CTT GGA G
smeT135	Junto a sme46 amplifica una zona de 158 pb que contiene el operador de <i>SmeT</i> .	AAA GCC CGC AGA TCG CGC CCA
SmetNde1	Introduce un sitio de restricción para la enzima NdeI en el extremo 5' de <i>smeT</i> .	GGA ATT CCA TAT GGC CCG CAA GAC CAA AGA GGA
smetSap1 (2)	Introduce un sitio de restricción para la enzima SapI en el extremo 3' de <i>smeT</i> .	GGT GGT TGC TCT TCC GCA CGC CTC GGG CAG CGG
T7 Universal Primer	Junto a Intein Reverse Primer amplifica el inserto dentro del plásmido pTYB1.	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

3.3. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

3.3.1. MEDIOS Y CONDICIONES GENERALES

Como medio de cultivo rico se empleo Luria-Bertani (LB) y para los ensayos con antibióticos se usó caldo Mueller Hinton (MH) (Atlas, 1993). Salvo que se especifique lo contrario las cepas de *S. maltophilia* y *E. coli* (ver Tabla 2) se crecieron a 37° C.

3.3.2. ESTUDIOS DE ANTAGONISMO ENTRE BIOCIDAS Y CIPROFLOXACINA

Para los ensayos de antagonismo entre biocidas y ciprofloxacina se sembraron diluciones (3:100.000) de cultivos en fase estacionaria de *S. maltophilia* D457 en placas de Agar Mueller Hinton. Tras dejarlas secar se depositaron 2 tiras de Etest® (AB bioMérieux) con ciprofloxacina. En una de las tiras se situó, próxima al valor de CMI de ciprofloxacina en *S. maltophilia* D457 (0,75 µg/ml), otra tira de 5 cm x 0,5 cm de papel Whatman® que contenía 30 µl de cada biocida a las concentraciones respectivas de 1 mg/ml de triclosán, 1 mg/ml de cloruro de benzalconio y 0,15 mg/ml de hexaclorofeno. En uno de los rectángulos de papel Whatman® en vez de biocida se añadió etanol para tener un control del efecto del solvente sobre la CMI de antibiótico. Las placas se incubaron a 37° C durante 24 horas.

3.3.3. ESTUDIOS DE ANTAGONISMO ENTRE EXUDADOS DE PLANTAS Y CIPROFLOXACINA

Los ensayos de antagonismo entre exudados de plantas y ciprofloxacina se realizaron de un modo similar al descrito en 3.3.2. Se sembraron diluciones (3:100.000) de cultivos en fase estacionaria de *S. maltophilia* D457 en placas de Agar Mueller Hinton. Tras dejarlas secar se depositó una tira de Etest® (AB bioMérieux) con ciprofloxacina y próximo a su valor de CMI se depositó otra tira de 5 cm x 0,5 cm de papel Whatman® que contenía 30 µl de los exudados de plantas (floreтина, ácido salicílico, naringenina, apigenina y genisteína) a una concentración de 40 mM. Las placas se incubaron a 37° C durante 24 horas.

3.3.4. CURVAS DE CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE TRICLOSÁN Y ANTIBIÓTICOS

Una dilución (1:1000) de un cultivo en fase estacionaria de *S. maltophilia* D457 se fraccionó en 2 alícuotas añadiendo en una de ellas triclosán hasta una

concentración final de 3 µg/ml y a la otra el mismo volumen de etanol (control). Las 2 alícuotas, con o sin triclosán, se distribuyeron en una placa de 96 pocillos cargando 198 µl por pocillo a los que posteriormente se añadieron 2 µl de antibióticos. Las concentraciones finales usadas fueron: 6 µg/ml de ácido nalidíxico, 1 µg/ml de ofloxacina, 6 µg/ml de norfloxacin y 1 µg/ml de ciprofloxacina. Las bacterias crecieron durante 30 horas a 37 °C y se midió la OD_{595nm} cada 20 minutos con un lector de placas Tecan Infinite ® 200. Los datos se representaron gráficamente usando Microsoft Excel.

3.3.5. SELECCIÓN DE MUTANTES DE *S. maltophilia* EN CLORURO DE BENZALCONIO Y HEXACLOROFENO

Para seleccionar los mutantes resistentes a hexaclorofeno o a cloruro de benzalconio, se plaquearon 100 µl de un cultivo en fase estacionaria de *S. maltophilia* D457 en LB sobre placas de MH-agar que contenían concentraciones inhibitorias de cloruro de benzalconio (128 µg/ml) o hexaclorofeno (16 µg/ml). Los mutantes se recogieron tras 48 h a 37 °C. Para verificar que las bacterias aparecidas no eran una contaminación se realizó una PCR, usando PCR Master Mix (Promega), con los cebadores específicos para *S. maltophilia* sme46 y sme47 (ver Tabla 3). Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización a 95 °C durante 5 min., seguido de 30 ciclos de 95 °C (desnaturalización) durante 45 seg., 55 °C (anillamiento) durante 30 seg., y 72 °C (extensión) durante 45 seg., y una extensión final de 7 min. a 72 °C. En todas las colonias estudiadas se verificó con un gel de 1% agarosa en TAE que el fragmento amplificado era de la longitud deseada (223 pb).

La frecuencia de mutación de cada biocida se calculó con la fórmula:

$$F = \frac{\text{Número de mutantes}}{\text{Número total de células por ml}}$$

3.3.6. DETERMINACIÓN DE CMI_s DE MUTANTES EN HEXACLOROFENO Y CLORURO DE BENZALCONIO

Las CMI_s de los mutantes en los diferentes antibióticos se midieron con tiras de Etest® (AB bioMérieux) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los resultados se refieren a la media de 2 experimentos.

3.3.7. CURVAS DE CRECIMIENTO DE MUTANTES DE *S. maltophilia* SELECCIONADOS EN CONCENTRACIONES INHIBITORIAS DE CLORURO DE BENZALCONIO Y HEXACLOROFENO.

A partir de una colonia de cada uno de los 14 mutantes (7 aparecidos en hexaclorofeno y 7 aparecidos en cloruro de benzalconio) se inició un cultivo en LB a 37 °C. Cuando los mutantes habían alcanzado la fase estacionaria se los diluyó hasta que todos presentaban una $OD_{600} \approx 0,1$. Estas diluciones se distribuyeron en una placa de 96 pocillos cargando 200 µl por pocillo. Las bacterias crecieron durante 30 horas a 37 °C midiendo la OD_{595nm} cada 20 minutos con un lector de placas Tecan Infinite ® 200. Los datos se representaron gráficamente usando Microsoft Excel.

3.4. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

3.4.1. ENSAMBLAJE DEL GENOMA DE *S. maltophilia* D457

El genoma de *S. maltophilia* D457 fue purificado usando GNOME® DNA Isolation Kit (Q-BIOgene) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La base de datos que se ha utilizado en este trabajo es una mezcla de las obtenidas por Pyrosecuenciación, *Pair end* y 3/8 de placa de *Titanium paired end*. Las 3 fueron secuenciadas en Macrogen (Corea). Para el ensamblaje de *contigs* se utilizó el programa GAP4 (paquete Staden). El ensamblaje del genoma se está haciendo en colaboración con Francisco Silva (Instituto Cavanilles de Biodiversidad. Valencia)

La ausencia o presencia, en la cepa *S. maltophilia* D457 de los fragmentos específicos para cada uno de los genomas de *S. maltophilia* K279a y R551-3, en el proyecto de secuenciación de D457 se comprobó con el programa para búsqueda en base de datos *local blastn* del paquete BioEdit. Los resultados son la suma de los *hits* que tenían una identidad mayor a 80% y de tamaño superior a 30 pb (ver archivos Excel en el CD).

3.4.2. PREDICCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA PROTEÍNA SmeT

El peso molecular de SmeT y su coeficiente de extinción molar fueron calculados con la herramienta ProtParam tool (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>).

3.4.3. DOCKING DE EFECTORES EN LA ESTRUCTURA DE SmeT

La interacción, *in silico*, de los posibles efectores con el bolsillo de unión de SmeT se analizó mediante estudios de *docking* usando el programa AutoDock4. Se consideró la flexibilidad de los ligandos pero no la de la proteína. El área de *docking* se restringió al bolsillo de unión de la proteína. Los resultados se analizaron con el programa AutodockTools 1.5.4. Estos estudios se han hecho en colaboración con Aldo Segura y Florencio Pazos (CNB-CSIC)

3.4.4. BÚSQUEDA DE UN GEN *qnr* EN EL GENOMA DE *S. maltophilia*

La búsqueda de Sm*qnr* se realizó usando el programa *blastx* contra bases de datos de genomas completos *NCBI genomic BLAST* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi) y contra la base de datos *Non-redundant protein sequences (nr)* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), ambas disponibles en la página web del NCBI. Como secuencia de referencia se usó la proteína plasmídica QnrB1 de *K. pneumoniae*. El dominio COG1357 fue identificado usando *Conserved Domain Database and Search Service* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>).

3.4.5. BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS Qnr EN GENOMAS Y METAGENOMAS AMBIENTALES

La búsqueda de genes *qnr* en bases de datos de genomas completos y WGS se realizó usando el programa *blastx* en *NCBI genomic BLAST* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi). Como secuencias de referencia se usaron las secuencias de aminoácidos de las proteínas Qnr codificadas en plásmidos: QnrA1 (YP_002332855.1), QnrB1 (ABG82188.1), QnrC (ACK75961.1), QnrD (YP_002504364.1) y QnrS1 (ACU68558.1) disponibles en la base de datos del NCBI.

Para la búsqueda de genes *qnr* en bases de datos de metagenomas ambientales se usó el programa *TFASTX* de *Whole Genome Shotgun Sequence Similarity Search* disponible en el sitio web del EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/wgs.html>) y se buscó en todas las bases de datos ambientales disponibles.

3.4.6. ALINEAMIENTOS Y ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LAS PROTEÍNAS

Qnr

Todas las secuencias de aminoácidos de proteínas Qnr, excepto SmaQnr (Velasco et al., 2009) y MtgQnr (Rusch et al., 2007), se obtuvieron de la página web del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los alineamientos múltiples de proteínas Qnr fueron realizados con el programa ClustalW2 (Thompson et al., 2002) y el editor de alineamientos Jalview (Clamp et al., 2004) usando los parámetros predeterminados por defecto (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html). El árbol de identidad entre las distintas proteínas Qnr se calculó usando el método "Average distance using percentage of identity" con el programa ClustalW2.

3.4.7. ANÁLISIS DEL ENTORNO GÉNICO DE LAS PROTEÍNAS Qnr

CROMOSÓMICAS

Los entornos génicos de las proteínas Qnr cromosómicas se obtuvieron del sitio web del NCBI. Los números de acceso a los genomas o proyectos de *Whole Genome Shotgun* se listan a continuación: *Aeromonas hydrophila* (NC_008570.1), *Aeromonas salmonicida* (NC_009348.1), *Aliivibrio salmonicida* (NC_011312.1), *Citrobacter youngae* (ABWL02000005.1), *Moritella* sp. (NZ_ABCQ01000005.1), *Photobacterium angustum* (NZ_AAOJ01000002.1), *Photobacterium damsela* (ADBS01000001.1), *Photobacterium profundum* (NC_006371.1), *Providencia alcalifaciens* (NZ_ABXW01000070.1), *Psychromonas* sp. (NZ_AAPG01000006.1), *Serratia odorifera* (ADBX01000001.1), *Serratia proteamaculans* (NC_009832.1), *Shewanella benthica* (NZ_ABIC01000005.1), *Shewanella frigidimarina* (NC_008345.1), *Shewanella halifaxensis* (NC_010334.1), *Shewanella loihica* (NC_009092.1), *Shewanella pealeana* (NC_009901.1), *Shewanella piezotolerans* (NC_011566.1), *Shewanella sediminis* (NC_009831.1), *Shewanella woody* (NC_010506.1), *Stenotrophomonas maltophilia* K279a (NC_010943.1), *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3 (NC_011071.1), *Vibrio alginolyticus* (ACZB01000007.1), *Vibrio coralliilyticus* (ACZN01000017.1), *Vibrio fischeri* (NC_011184.1), *Vibrio furnissii* (ACZP01000014.1), *Vibrio harveyi* (NZ_AAWP01000008.1), *Vibrio orientalis* (ACZV01000005.1), *Vibrio parahaemolyticus* (ACKB01000054.1), *Vibrio shilonii* (NZ_ABCH01000003.1), *Vibrio splendidus* (NZ_AAMR01000006.1), *Vibrio vulnificus* (NC_004460.1), *Yersinia bercovieri* (NZ_AALC02000046.1).

El entorno génico de SmQnr en *S. maltophilia* D457 se obtuvo por comparación del *contig* FG3OI7E02GX9RT (ver CD adjunto) con la base de datos del NCBI *Non-redundant protein sequences (nr)* usando el programa *blastx*. El *contig* FG3OI7E02GX9RT es un *contig* de 75.400 pb de nuestro proyecto de secuenciación de *S. maltophilia* D457. La secuencia de Smqnr se localizaba entre las posiciones 42.490 y 43.250.

3.4.8. PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE SmQnr

El modelado de la estructura de SmQnr se hizo combinando *template based* y predicción *ab initio* usando el servidor Robetta (<http://robetta.bakerlab.org>). El archivo PDB se visualizó con *Swiss-PdbViewer* (Guex and Peitsch, 1997).

El cálculo cualitativo de la carga electrostática en vacío de la superficie de las proteínas SmQnr y MfpA se realizó con PyMol. El archivo PDB de MfpA (2KGS) se obtuvo del *RCSB Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

3.5. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ADN

3.5.1. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO QUE EXPRESA LA PROTEÍNA RECOMBINANTE CBD-Intein-SmeT

El gen *smeT* fue amplificado a partir del plásmido pPS6 (4) mediante PCR usando PCR Master Mix (Promega). Se diseñaron los cebadores smetNdeI y smetSapI(2) (ver Tabla 3) que introducían sitios de restricción para las enzimas NdeI y SapI respectivamente. Las condiciones de PCR fueron: una primera desnaturalización a 95 °C durante 5 min. seguido de 30 ciclos de 95 °C (desnaturalización) durante 60 seg., 55 °C (anillamiento) durante 30 seg., y 72 °C (extensión) durante 2 min, y una extensión final de 10 min. a 72 °C. El producto de PCR fue extraído de un gel de 1% agarosa en TAE (Sambrook, 2001) usando el kit *Illustra™ DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) y posteriormente fue digerido con NdeI (New England Biolabs) y SapI (NEB). Este fragmento fue clonado en fase en el vector pTYB1 (IMPACT-CN system, NEB) que previamente había sido digerido con las mismas enzimas de restricción. Mediante secuenciación se comprobó que la PCR no había introducido ningún error y el inserto estaba correctamente orientado y en fase. El nuevo plásmido, llamado pAHF1, que codificaba la proteína de fusión SmeT-Intein-CBD fue usado para transformar la cepa de *E. coli* ER2566 (IMPACT-CN system, NEB) (Chong et al., 1998) que permite la sobreexpresión de proteínas recombinantes fusionadas a inteína.

3.5.2. OBTENCIÓN DE SONDAS RADIOACTIVAS PARA LOS ENSAYOS DE UNIÓN SmeT-ADN

3.5.2.1. MARCAJE RADIOACTIVO DE LA ZONA INTERGÉNICA SMED-SmeT PARA LOS ENSAYOS DE FOOTPRINTING Y NUCLEÓSIDO PERDIDO

Para generar sondas de ADN marcado que contuvieran la región intergénica *smeD-smeT* se amplificó esta zona de 223 pb mediante PCR marcando uno de los dos cebadores radiactivamente. Los cebadores *sme46* y *sme47* (ver Tabla 3) fueron marcados en su extremo 5' con [γ -³²P]dATP (GE Healthcare Bio-Sciences) usando T4 polinucleótido quinasa (NEB) (Sambrook, 2001). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando PCR Master Mix (Promega) en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min., 30 ciclos de 95 °C (desnaturalización) durante 60 seg., 55 °C (anillamiento) durante 30 seg., y 72 °C (extensión) durante 1 min, y 10 min. a 72 °C para la extensión final. Los productos de PCR fueron separados en un gel desnaturalizante de 7M urea y 8% poliacrilamida y extraídos por el método de “*crush-and-soak*” (Kohler et al., 2001).

3.5.2.2. OBTENCIÓN DE UNA SONDA RADIOACTIVA DE 158 pb PARA LOS ENSAYOS DE NUCLEÓSIDO PERDIDO

La sonda de 158 pb usada para visualizar los nucleótidos necesarios para la unión de SmeT a su operador en la cadena que codifica *smeT* se obtuvo por PCR usando los cebadores *sme135* radioactivo y *sme46* (ver Tabla 3). Las condiciones de PCR y marcaje fueron las mismas que para la amplificación de la zona intergénica *smeD-smeT*.

3.5.2.3. MARCAJE RADIOACTIVO DEL OPERADOR DE SmeT

La sonda radioactiva de 30 pb que contiene el operador de SmeT, Sonda Central, se generó marcando radiactivamente el oligonucleótido de la cadena que codifica *smeT* (Op30C(+)) y posteriormente hibridándolo con su complementario (Op30C(-)). Las condiciones de marcaje fueron las mismas que para la zona intergénica *smeD-smeT* y la hibridación se realizó calentando las muestras a 90 °C durante 3 minutos y dejándolas enfriar a temperatura ambiente.

3.5.3. IDENTIFICACIÓN Y CLONACIÓN EN *E. coli* DEL GEN *Smqnr* DEL CROMOSOMA DE *S. maltophilia*

El genoma de *S. maltophilia* D457 se purificó con *GNOME® DNA Kit* (Q-BIOgene) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los cebadores usados para amplificar *Smqnr* fueron QnrM(+) y QnrM(-) (ver Tabla 3) obtenidos a partir de la secuencia del cromosoma de *S. maltophilia* K279a. Para la reacción de PCR se utilizó PCR Master Mix (Promega) con las siguientes condiciones: una primera desnaturalización a 94° C durante 5 min. seguido de 35 ciclos de 94° C (desnaturalización) durante 30 seg., 55 °C (anillamiento) durante 45 seg. , y 72 °C (extensión) durante 1 min, y una extensión final de 7 min. a 72 °C. La amplificación de un producto de PCR de 660 pb se confirmó en un gel de agarosa 1% TAE (Sambrook, 2001). El producto de PCR se purificó con *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) y se clonó en el plásmido pGEM-T (Promega). El plásmido recombinante se transformó en *E. coli* KZM120 de acuerdo a (Sambrook, 2001), y fue posteriormente purificado usando *Wizard® Plus SV Miniprep Kit* (Promega) . La secuenciación del inserto del plásmido fue realizada por Secugen S.L. (<http://www.secugen.es>) y los cebadores usados fueron M13 forward and M13 reverse. Previo a los ensayos de CMI se comprobó que el marco de lectura respecto al promotor *lac* de pGEM-T era correcto.

3.6. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ARN

3.6.1. EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL

El ARN total se obtuvo, en todos los casos, tras inocular 15 ml de LB con 15 µl de un cultivo en fase estacionaria crecido a partir de una colonia de *S. maltophilia* D457. Cuando la $OD_{600} \approx 1.0$ las células se recogieron centrifugando a 6000 x g durante 10 minutos a 4 °C y se congelaron inmediatamente con hielo seco antes de su almacenaje a -80 °C. Tras descongelar los sedimentos celulares el ARN total se extrajo usando RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

En los casos en que se midió la respuesta a efectores, el medio de cultivo contenía concentraciones subinhibitorias de los mismos (triclosán y floretina a 15 µg/ml, naringenina, quercetina, apigenina, genisteína, ácido salicílico y ácido acetil salicílico a 10 µg/ml, cloruro de benzalconio a 3,5 µg/ml y hexaclorofeno a 1,5 µg/ml).

3.6.2. TRATAMIENTOS CON ADNasa I Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN TOTAL

El primer tratamiento con ADNasa I se hizo usando RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para eliminar posibles restos de ADN se hizo un segundo tratamiento con ADNasa I, usando TURBO DNA-free™ (Ambion) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN se verificó en geles de agarosa al 1% y la ausencia de ADN se comprobó por RT-PCR usando los oligonucleótidos *gyrA*(+) and *gyrA*(-) (ver Tabla 3). La concentración total de ARN se cuantificó usando un nanodrop.

3.6.3. RETROTRANSCRIPCIÓN, DISEÑO DE CEBADORES Y RT-PCR

Por cada muestra, 1 µg de ARN total fue retrotranscrito a cDNA usando *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (AB Applied Biosystems) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las condiciones de RT-PCR y cuantificación fueron de las descritas en (Morales et al., 2006). Brevemente, una primera desnaturalización a 95°C por 10 min seguida de 40 ciclos (95°C por 15 s, 60°C por 1 min) de amplificación.

Los cebadores fueron diseñados con el programa Primer Express 3.0 (AB Applied Biosystems) usando los parámetros predeterminados. Mediante RT-PCR en tiempo real se analizó la transcripción de los genes *smeC*, *smeD*, *smeJ*, *smeY* y como control se usó *gyrA*. Las diferentes parejas de cebadores para cada uno de estos genes y el tamaño de los fragmentos amplificados se especifican en la Tabla 3. Las diferencias en la cantidad relativa de ARNm para los distintos genes estudiados fueron estimadas según el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (3).

3.7. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

3.7.1. EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SmeT

La cepa *E. coli* ER2566 que contiene el plásmido pAHF1 fue crecida a 37°C en medio Luria-Bertani con 100 µg/ml de ampicilina. La expresión de SmeT-inteína-CBD se indujo en fase exponencial tardía ($OD_{600} \approx 0,8$) con 0.5 mM IPTG y continuó durante 16 horas a 15°C. Para recoger las células, el cultivo fue centrifugado a 5000 x g durante 15 min. a 4°C y el sedimento fue resuspendido en TBS (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 8). La suspensión de células fue distribuida en alícuotas y congelada a -20°C.

Para la purificación de SmeT se descongeló una alícuota de células y se añadió PMSF hasta una concentración final de 1mM para inhibir las serín-proteasas. Las células se rompieron por sonicación y se añadió el detergente Tritón X-100 hasta una concentración final de 1%. El lisado fue incubado en hielo 30 min. y las proteínas solubles fueron separadas centrifugando 30 min. a 20.000 x g a 4°C. Las posibles impurezas en el sobrenadante fueron eliminados con filtros de 0.45 µm (Millipore). El filtrado se hizo pasar por columnas Poly-Prep® Chromatography Column (BIO-RAD) que contenían una matriz con quitina (NEB). Las proteínas no unidas o unidas inespecíficamente fueron eliminadas lavando con 20 volúmenes de TBS seguido de 3 volúmenes de tampón de corte de inteína (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 100 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8). La matriz empapada en este tampón se dejó 16 h a 4 °C para que el DTT posibilitara el corte entre SmeT y la inteína. Al añadir tampón de elución la inteína quedó en la columna unida a la matriz mediante el dominio CBD y la proteína SmeT pura fue eluída.

3.7.2. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

La purificación de SmeT se confirmó con un gel desnaturalizante SDS-PAGE. Para ello, la proteína eluída fue resuspendida en tampón Laemmli con β-mercaptoetanol, hervida y cargada en un gel que contenía un 12% de acrilamida y 0,1% de SDS (Sambrook, 2001). El gel se tiñó con 0.025% azul de Coomassie R.

La concentración de proteína se determinó por absorbancia a 280nm asumiendo que el coeficiente de extinción para esta proteína era de $\epsilon_{280\text{ nm}} = 9970\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (ver materiales y métodos 3.4.2) y se confirmó con el ensayo del ácido bicinconínico (BCA, PIERCE) usando BSA como patrón.

3.7.3. WESTERN BLOTTING DE SmeT

El análisis por Western blot se hizo esencialmente según las instrucciones del fabricante de *ECL plus Western blotting detection system* (GE Healthcare). La proteína SmeT purificada fue cargada en un gel SDS-PAGE al 8% y posteriormente electro-transferida a 150mA y 4 °C, a una membrana de PVDF (Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore)) en tampón de transferencia (192 mM glicina, 25mM Tris, pH 8.3) durante 1 h. La membrana se trató 16 horas con tampón de bloqueo (3% leche descremada, 0.1% Tween, 20mM Tris HCl, 0.5M NaCl, pH 7) y después se incubó con anticuerpo de conejo policlonal contra SmeT (1:10.000) (Sanchez et al., 2002) en TTBS (0.1% Tween, 20mM Tris HCl, 0.5M NaCl, pH 7) durante 1 h. Se utilizó anticuerpo secundario anticonejo conjugado a HRP (Bio-Rad)

diluido 1:20.000 en TTBS. SmeT fue detectado usando *ECL plus Western blotting detection system* (GE Healthcare).

3.7.4. CRISTALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE SmeT

Previamente a su cristalización la proteína SmeT fue sometida a otro paso de purificación en una columna de Sephacryl 100 usando el tampón 20 mM Tris, pH 8.0 y 300 mM NaCl. Posteriormente la proteína se concentró a 5 mg/ml y los cristales se obtuvieron por el método de difusión de vapor. Como agente cristalizante se usó una solución de 200 mM Li₂SO₄, 28% MME2000, y 100 mM Tris, pH 8.5. Los datos de difracción se recogieron en el *European Synchrotron Radiation Facility beamline BM14* (Grenoble, Francia). Este trabajo se hizo en coloración con María Jesús Maté, Federico Martín y Antonio Romero (CIB-CSIC).

3.8. ENSAYOS DE RETARDO EN GEL (EMSA)

Los ensayos de retardo en gel se hicieron según (Rojo and Alonso, 1995). Brevemente, se incubó la sonda de doble cadena de 30 pb que contenía el operador, Sonda Central (ver 3.2), con concentraciones crecientes de SmeT (0, 110, 220, 440, 660, 880 and 1600 nM) en tampón de unión (10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 10mM MgCl₂, 1mM EDTA [pH 7.2], 50 µg/ml BSA, 1mM ditiotretitol, 5% [vol/vol] glicerol y 100 µg/ml poli[dl-C] como ADN competidor inespecífico). Para los ensayos de competición, en tres de las reacciones las sondas se incubaron, además de con SmeT, con cantidades crecientes de la Sonda Central no marcada. Después de 30 minutos las muestras se cargaron en un gel no desnaturizante de 6% poliacrilamida (37.5:1 acrilamida: bisacrilamida) en tampón 1X TBE (89 mM Tris-borato y 2 mM EDTA). La electroforesis se realizó durante 90 min. a 125 V. Los complejos formados se detectaron, tras secar el gel, por autorradiografía.

3.9. IMPORTANCIA DE LOS NUCLEÓTIDOS DISTALES DEL OPERADOR

Para determinar la importancia de los nucleótidos distales del operador se realizaron EMSA con 3 sondas de doble cadena marcadas radiactivamente que contenían el operador o parte de él. La denominada Sonda Central contenía los 28 pb que constituyen el operador mas un nucleótido de cada extremo, la Sonda

Izquierda, estaba desplazada 9 nucleótidos hacia el inicio de transcripción de *smeT* y la Sonda Derecha estaba desplazada 9 nucleótidos hacia el inicio de transcripción de *smeD*. Las condiciones de los EMSA son las mismas que las descritas anteriormente (ver 3.8) exceptuando que la concentración de SmeT usada fue 0,8 μ M. Las secuencias de estas 3 sondas de 30 pb se encuentran la Tabla 3.

3.10. ENSAYOS DE RETARDO EN GEL (EMSA) CON EFECTORES

Las condiciones para los ensayos de retardo en gel con efectores fueron las mismas que las descritas en (3.8) pero con las siguientes modificaciones. La sonda se incubó con la proteína SmeT (a una concentración de 0,2 μ M) durante 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se añadieron los efectores dejando incubar 15 minutos más. Las concentraciones finales de los efectores estudiados fueron: para antibióticos 3 mM, para biocidas 0,1 mM y 0,2 mM, y para los exudados de plantas concentraciones crecientes hasta 2 mM. (0,06, 0,12, 0,25, 0,5, 1 y 2 mM). El gel, la electroforesis y el revelado se realizaron como se describió anteriormente (3.8).

3.11. ENSAYOS DE FOOTPRINTING CON ADNasa I

Los ensayos de *footprinting* con ADNasa I se hicieron básicamente como se describe en (Rojo and Alonso, 1995). La cadena que codifica *smeD* se marcó en su extremo 5' usando el cebador radiactivo sme46. Las condiciones de PCR e incubación de la región intergénica y SmeT fueron las mismas que para los ensayos de retardo. Tras la incubación, las muestras fueron digeridas con 0.05 U de ADNasa I (Roche) durante 3 minutos a temperatura ambiente. La digestión se detuvo añadiendo EDTA (20 mM concentración final) y el ADN se precipitó con 0.3 M acetato de potasio y 2.5 volúmenes de etanol. Los fragmentos de ADN fueron resuspendidos en tampón de carga con formamida, separados por electroforesis en un gel de secuenciación con 8% poliacrilamida y 7 M urea y visualizados por autorradiografía. Como referencia se utilizó una reacción de secuenciación de la misma cadena de ADN preparada por el método Maxam y Gilbert (Maxam and Gilbert, 1977).

Para la cadena que codifica *smeT* se procedió del mismo modo pero usando el cebador sme47 marcado y realizando la electroforesis en un gel de secuenciación con 6% poliacrilamida y 7 M urea.

3.12. ENSAYOS DE NUCLEÓSIDO PERDIDO

Los ensayos de nucleósido perdido o interferencia por radical hidroxilo se hicieron básicamente como se describe en (Rojo and Alonso, 1995). Para la cadena que codifica *smeD*, la sonda radiactiva con la región intergénica *smeD-smeT* se trató con 3 μ l de una solución con 4 mM EDTA, 2 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 16 mM ascorbato sódico y 7 % H_2O_2 . Tras 4 minutos la reacción se detuvo añadiendo 2 μ l de 100 mM tiourea y 2 μ l 0.5 M EDTA. Los fragmentos de ADN fueron precipitados con etanol y posteriormente resuspendidos en 20 μ l de tampón de unión (el mismo que para los EMSA, ver 3.8) e incubados con SmeT durante 40 minutos a temperatura ambiente. Los fragmentos de ADN libres y unidos fueron separados en un gel no desnaturizante de 6% poliacrilamida en 1 X TBE del cual se extrajeron por el método de “*crush and soak*” (Rojo and Alonso, 1995). Finalmente, las muestras se resuspendieron en tampón de carga con formamida y se analizaron en un gel de secuenciación con 8% poliacrilamida y 7 M urea. Como referencia se utilizó una reacción de secuenciación de la misma cadena de ADN preparada por el método Maxam y Gilbert (Maxam and Gilbert, 1977).

Para la cadena que codifica *smeT* las condiciones fueron las mismas pero la sonda marcada radiactivamente era una zona de la región intergénica *smeT-smeD* de 158 pb (ver materiales y métodos 3.5.2.2).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE *S. maltophilia* D457

Durante la realización de esta tesis se publicaron los genomas de 2 cepas de *S. maltophilia*. La primera, K279a, es una cepa obtenida de una muestra de sangre de un paciente en quimioterapia que sufrió una infección que no respondía a tratamiento con antibióticos (Crossman et al., 2008). La segunda cepa, R551-3, es un aislado obtenido a partir de muestras de raíces, rizosfera y tallo de una especie de álamo (*Populus trichocarpa*) (Lucas S., 2008). El análisis comparativo de estos genomas muestran que *S. maltophilia* contiene un único cromosoma circular, de 4,8 Gb en K279a y 4,5 Gb en R551-3, con un alto contenido en G+C (66 % en ambas cepas). Como ya se comentó en la Introducción ambas cepas comparten muchos de los elementos que confieren resistencia intrínseca a antibióticos en *S. maltophilia*, sin embargo hay ciertas zonas de más de 3 genes consecutivos que solo aparecen en una de las cepas (Rocco et al., 2009). Hemos iniciado un proyecto de secuenciación y anotación de la cepa clínica *S. maltophilia* D457 (ver materiales y métodos 3.4.1) con el objeto de estudiar si las diferencias entre la cepa ambiental y la cepa clínica son debidas a adaptaciones a su entorno. Si esto fuera así, nuestra cepa de estudio D457 compartiría la mayor parte de los genes presentes en K279a (de origen clínico) y carecería de aquellos que solo aparecen en R551-3 (endofítica).

El ensamblaje del genoma se está haciendo en colaboración con Francisco Silva (Instituto Cavanilles de Biodiversidad. Valencia) y a pesar de estar en un estado inicial, actualmente disponemos de varios fragmentos del cromosoma suficientemente grandes (7 *contigs* de 100 Kb, 30 de 50Kb, 76 de 20Kb y 113 de 10 Kb) para confirmar la ausencia o presencia en D457 de los genes que diferencian las 2 cepas ya secuenciadas (ver materiales y métodos 3.4.1). Los resultados se muestran en la Tabla 4. En resumen, podemos decir que de las 27 regiones genómicas presentes en la cepa asociada a plantas R551-3 que no aparecen en el cromosoma de la cepa clínica K279a solo encontramos parte de 3 en nuestra cepa clínica D457. Sin embargo, casi la mitad (8 de 19) de las regiones presentes solo en K279a también aparecen en D457. Este resultado preliminar sugiere que aunque el genoma *core* de las distintas cepas de *S. maltophilia* está conservado, existen ciertas diferencias dependientes del nicho que ocupa la bacteria.

	Región	Genes	Tamaño (Kb)	Rol hipotético	Genes hipotéticos que contiene	% del inserto en D457	% identidad con D457
K279a	3	0285-0333	37,5	Profago intacto	Integrasa de fago, proteínas de fago.	62%	86%
	6	1211-1219	7,4		Proteínas transmembrana, reguladores de doble componente, tioredoxina para exportación.	100%	94%
	7	1282-1336	43,5	Potencial transposón conjugativo	Proteínas de transferencia en conjugación (TraG, TrbBCDEJLFGI), reguladores de las familias LysR y MerR), esterasa, NAD(P)H deshidrogenasa, 4-carboximuconolactona descarboxilasa, transportador de la familia MFS, proteínas de partición (ParAB, RepA), transposasas, proteína de reparación de ADN RadC, Integrasa.	55%	86%
	12	2518-2589	64,9		Proteínas transmembrana, esterasa/cloroperoxidasa, excinucleasa ABC, oxidoreductasa de unión a hierro-azufre, DNA ligasa, DNA-formamidopirimidina glicosilasa, catalasa, alcohol deshidrogenasa dependiente de zinc, isocorismatasa, sistema de transporte dependiente de fructosa PTS, oxidoreductasa, proteínas transmembrana, receptor dependiente de TonB, 1,4-beta-glucosidasa, porina, transportador de la familia ABC, reguladores (familias LacI, LysR), 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa, reductasa FMN dependiente de NADH, metionina sintasa, tripsina, beta-lactamasa AmpC.	79%	88%
	13	2628-2641	12,8		Proteínas transmembrana, proteína de transporte de cationes, DNA glicosilasa, proteína de señalización GGDEF GAF, exodeoxiribonucleasa, trehalosa sintasa, deshidrogenasa/oxidoreductasa.	100%	93%
	14	2755-2761	12,1		Enzima desramificadora de glicógeno (GlgX), alfa amilasa/glicosil hidrolasa, 4-alfaglucanotransferasa, maltooligosiltrehalosa, enzima ramificadora 1,4 (GlgB), glicogeno sinthasa (GlgA)	100%	90%

	16	4140-4164	25,5		Proteína transmembrana, transportador de la familia MFS, proteína de resistencia a glioxilasa/bleomicina, reguladores transcripcionales de las familias AraC y TetR, precursor de serinproteasa extracelular, proteína de quimiotaxis aceptora de metilo, proteína de la familia RHS, receptor TonB-dependiente, proteína GST, proteína HNS de unión a DNA, proteína de la familia betalactamasa- glicosiltransferasa.	48%	86%
	17	4423-4430	8,3		Proteína de adhesión no fimbrial (AfaD), proteínas transmembrana, proteína de la familia RHS.	61%	92%
R551-3	11	1580-1588	10,1	Transportador de colicina V, peptidasa	Peptidasa (subtilisina, kexina, sedolisina), proteína de secreción de colicina V (MFP), transportador de secreción de colicina V de la familia ABC, proteína de membrana, proteína de función desconocida con un dominio CAAX de proteasa, GCN5 N-acetiltransferasa.	50%	87%
	16	2094-2114	19,7	Toxina de paramecio	Proteínas RebAB, reguladores transcripcionales de las familias AraC y TetR, tirosina fosfatasa, receptor TonB-dependiente, transportador de la familia MFS, proteína de señalización GGDEF GAF.	55%	90%
	21	2845-2849	10,0	Resistencia al teluro	Proteína de resistencia al teluro (KlaAB/TelAB).	100%	90%

Tabla 4. Comparación de las regiones de genes presentes/ausentes en las cepas de *S. maltophilia* K279a, R551-3 y D457.

Esta tabla está hecha a partir de la publicada por (Rocco et al., 2009). Solo se consideraron aquellas regiones en las que una zona de más de 3 genes consecutivos es compartida por las secuencias de nuestro proyecto de secuenciación de D457 y K279a o R551-3. Los números de las regiones génicas diferenciales se han mantenido como en el artículo. Todas las regiones contienen proteínas hipotéticas pero de función desconocida cuya identidad no se ha incluido en la tabla.

4.2. LA PROTEÍNA SmQnr

4.2.1. IDENTIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA Qnr-LIKE CODIFICADA EN EL CROMOSOMA DE *S. maltophilia*

Ya se comentó en la Introducción que al inicio de esta tesis doctoral la resistencia a quinolonas en *S. maltophilia* se atribuía a la baja permeabilidad de la membrana externa (Ba et al., 2004) y a la actividad de SmeDEF (Alonso and Martinez, 2001). Sin embargo, mediante análisis bioinformático, usando como referencia la proteína plasmídica QnrB1 para buscar en la base de datos de genomas completados del NCBI, se identificó dentro de los genomas de las 2 cepas de *S. maltophilia* secuenciadas (k279a y R551-3) un marco abierto de lectura que codificaba una proteína de la familia *Pentapeptide Repeat* de 219 aminoácidos (ver materiales y métodos 3.4.4). La nueva proteína, denominada SmQnr según las reglas de nomenclatura de (Jacoby et al., 2008), tiene un peso molecular de 24,3 kDa y presenta el motivo COG 1357, de función desconocida, que aparece en todas las proteínas Qnr. La identidad de SmQnr con las proteínas Qnr codificadas en plásmidos QnrA1, QnrB1, QnrC, QnrD y QnrS1 es de 38%, 58%, 36%, 58% y 36% respectivamente.

Recientemente se ha determinado que la expresión de ciertos genes de la familia *qnrB* están regulados por el sistema SOS en respuesta a daños en el ADN (Wang et al., 2009). Para evaluar la posibilidad de que SmQnr, como otras proteínas QnrB-like (Velasco et al., 2009), estuviera regulada por LexA se realizó una búsqueda bioinformática de la secuencia teórica del operador que reconoce LexA en gammaproteobacterias (Erill et al., 2003). Delante de *Smqnr* no se encontró la caja típica de unión a LexA. Sin embargo, no podemos descartar que el sistema SOS controle la expresión de SmQnr ya que los trabajos sobre regulación por LexA en *Xanthomonas axonopodis*, una especie relacionada filogenéticamente con *S. maltophilia*, han descartado que la regulación por LexA requiera la teórica secuencia consenso y demuestran que puede haber variabilidad entre los operadores que el regulador reconoce (Yang et al., 2008). El gen *lexA* de *S. maltophilia* presenta la misma secuencia de autorregulación (AGTAGTAATACTACT) que en *X. axonopodis* lo que sugiere que las distintas secuencias que reconozca LexA en *S. maltophilia* no necesitan la típica caja consenso.

También se analizó el entorno génico de *Smqnr* en las 2 cepas de *S. maltophilia* ya secuenciadas (K279a y R551-3) y en la cepa D457 que actualmente estamos

ensamblando (ver materiales y métodos 3.4.7). En las 3 cepas los genes próximos a *Smqnr* son idénticos (ver Figura 7) y no contienen elementos que hagan pensar que *Smqnr* haya sido adquirido por HGT. Por el contrario, la conservación génica alrededor de *Smqnr*, independientemente del hábitat de la cepa, hace pensar que la proteína SmQnr juega un papel importante, pero que aún desconocemos, en la fisiología de *S. maltophilia*.

4.2.2. LA PROTEÍNA SmQnr DE *S. maltophilia* D457 DISMINUYE LA SENSIBILIDAD A QUINOLONAS EN EL HOSPEDADOR HETERÓLOGO *E. coli*

Para estudiar si la expresión de *Smqnr* tenía influencia en la sensibilidad a quinolonas, se amplificó el gen por PCR a partir de DNA genómico y fue clonado en el vector pGEM-T y posteriormente transformado en el hospedador heterólogo *E. coli* (ver materiales y métodos 3.4.4). Se usó la cepa *E. coli* KZM120 ya que tiene inactivo el sistema MDR mas importante en *E. coli* (AcrAB) y se ha demostrado que esto facilita la caracterización de mecanismos de bajo nivel de resistencia a antibióticos (Alonso and Martinez, 2000). Los niveles de sensibilidad a quinolonas en la cepa que contenían el plásmido recombinante eran ligeramente inferiores a los de la cepa isogénica de *E. coli* (ver Tabla 5).

Plásmidos	CMI (µg/ml)						
	CIP	ENX	LEV	GAR	GRP	TRV	MOX
pGEM-T	0.002	0.032	0.004	0.002	0.001	0.004	0.004
pAHq	0.004	0.064	0.008	0.004	0.004	0.016	0.008

Tabla 5. CMIs de quinolonas en *E. coli* KZM120 que expresa *Smqnr*.

En la tabla se muestra el incremento en CMI respecto a la cepa que contiene el plásmido PGEM-T sin inserto. Las quinolonas utilizadas fueron: ciprofloxacina (CIP), enoxacina (ENX), levofloxacina (LEV), garenoxacina (GAR), grepafloxacina (GRP), trovafloxacina (TRV) y moxifloxacina (MOX). También se estudiaron las CMIs de ácido nalidíxico (NAL), norfloxacina (NOR) y sparfloxacina (SPA) pero no se observaron diferencias entre los transformantes y la cepa isogénica. CMI en µg/ml

Mientras esperábamos la aceptación de la publicación de este trabajo se publicaron resultados de otro grupo que confirmaban que *Smqnr* aumenta los niveles de resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas cuando se expresaba en la cepa *E. coli* TOP10 (Shimizu et al., 2008)

4.2.3. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE GENES *qnr* EN CROMOSOMAS BACTERIANOS

Para identificar las bacterias que podrían ser los reservorios naturales de las proteínas Qnr se realizaron búsquedas en bases de datos de genomas bacterianos completos y secuencias de *Whole Genome Shotguns*, usando como referencia las proteínas plasmídicas QnrA1, QnrB1, QnrC, QnrD y QnrS1 (ver materiales y métodos 3.4.7). En los resultados solo se consideraron proteínas Qnr-like aquellas que contenían una identidad mayor del 53% con las proteínas Qnr plasmídicas anteriormente citadas (ver Tabla 8 en anexo).

De los 1193 genomas bacterianos, completos o en proceso, disponibles en la base de datos del NCBI a fecha 1 de abril de 2010, se encontraron genes que codificaban proteínas Qnr o Qnr-like en solo 33 especies. Todas ellas eran Gammaproteobacterias pertenecientes a los géneros *Aeromonas* (*A. hydrophila* y *A. salmonicida*), *Aliivibrio* (*A. salmonicida*), *Citrobacter* (*C. youngae*), *Moritella* (*Moritella* sp), *Photobacterium* (*P. angustum*, *P. damsela* y *P. profundum*), *Providencia* (*P. alcalifaciens*), *Psychromonas* (*Psychromonas* sp), *Shewanella* (*S. benthica*, *S. frigidimarina*, *S. halifaxensis*, *S. loihica*, *S. pealeana*, *S. piezotolerans*, *S. sediminis* y *S. woodyi*), *Serratia* (*S. marcescens*, *S. proteamaculans*, y *S. odorifera*), *Stenotrophomonas* (*S. maltophilia*) *Vibrio* (*V. alginolyticus*, *V. angustum*, *V. coralliilyticus*, *V. fischeri*, *V. furnissii*, *V. harveyi*, *V. orientalis*, *V. parahaemolyticus*, *V. shilonii*, *V. splendidus* y *V. vulnificus*) y *Yersinia* (*Y. bercovier*). La gran mayoría de estas bacterias tienen su hábitat en ambientes acuáticos lo que indicaría que las proteínas Qnr plasmídicas podrían tener su reservorio en bacterias acuáticas.

Gran parte de las nuevas proteínas Qnr-like encontradas estaban anotadas como proteínas hipotéticas y todas contenían el motivo común COG1357 cuya función se desconoce. Para los alineamientos múltiples (ver figura Figura 5) y el árbol de identidad (ver Figura 6) se nombraron de acuerdo a (Jacoby et al., 2008) según la especie en la que se encuentran (entre paréntesis se indican sus números de acceso): AhQnr (YP_854820.1), AsQnr (YP_001143795.1), AlsQnr (YP_002263022.1), CyoQnr (gb|ABWL02000005.1), MsQnr (ZP_01897167.1), SbeQnr (ZP_02157732.1), SfrQnr (YP_750786.1), ShaQnr (YP_001675958.1), SliQnr (ABO22341.1), SpaQnr (ABV89003.1), SodQnr (EFA18045.1), SpiQnr (YP_002312400.1), SprQnr (YP_001478290.1), SseQnr (ABV35251.1), SwoQnr (ZP_01539189.1), SmQnr (ZP_01643096.1), PalQnr (ZP_03320716.1), PpQnr

(CAG21998.1), PsQnr (EAS39797.1), PdaQnr (EEZ41208.1), PanQnr (ZP_01234687.1), PpQnr (ZP_01217889.1), ValQnr (ZP_01261394.1), VanQnr (ZP_01234687.1), VcoQnr (EEX32280.1), VfQnr (ZP_02136549.1), VfuQnr (EEX40320.1), VhQnr (ZP_01985396.1), VorQnr (EEX92304.1), VpQnr (ZP_01990287.1), VshQnr (ZP_01866232.1), VspQnr (ZP_00989608.1), VvQnr (AAO07889.1), YbeQnr (gb|AALC02000046.1|), MtgQnr (AACY020347520). En el análisis también se incluyó MtgQnr una proteína similar a Qnr encontrada en bases de datos de metagenomas ambientales (ver 4.2.4).

La presencia de genes *qnr* en el cromosoma de *Citrobacter*, *Moritella*, *Providencia*, *Psychromonas* y *Yersinia* no es del todo clara ya que los genes *Cyoqnr*, *Msqnr*, *Palqnr*, *Psqnr* e *Ybeqnr* se han encontrado en bases de datos de proyectos de secuenciación de genomas no completos. Además, en los cromosomas completados de especies de estos mismos géneros (*C. koseri*, *C. rodentium*, *P. ingrahamii*, *Y. enterocolitica*, *Y. pestis*, e *Y. pseudotuberculosis*) no aparecen genes *qnr*. Todo lo anterior apunta a que estas proteínas se encuentren codificadas en plásmidos o han sido recientemente adquiridas en los cromosomas de estas especies. La adquisición, por un cromosoma bacteriano, de parte de un plásmido que incluye un gen *qnr* se ha descrito ya en *Citrobacter werkmani* (Kehrenberg et al., 2008).

Para estudiar las similitudes de estas nuevas proteínas Qnr cromosómicas con las proteínas Qnr plasmídicas y cromosómicas ya descritas, se realizó un árbol de identidad usando el programa ClustalW2 (ver materiales y métodos 3.4.6). Debido a la gran similitud que presentan las proteínas Qnr plasmídicas que pertenecen a un mismo grupo, para calcular el porcentaje de identidad y el árbol se usó únicamente un representante de cada grupo (QnrA1, QnrB1, QnrC, QnrD y QnrS1). Según su identidad las proteínas Qnr se agrupan en 3 ramas. Una de ellas contiene las proteínas similares a las plasmídicas QnrB y QnrD, en la segunda estarían las similares a QnrA, QnrC y QnrS y la última estaría formada por las proteínas Qnr de *Aeromonas*. Los porcentajes de identidad entre las distintas proteínas Qnr se detallan en el Anexo 1.1.

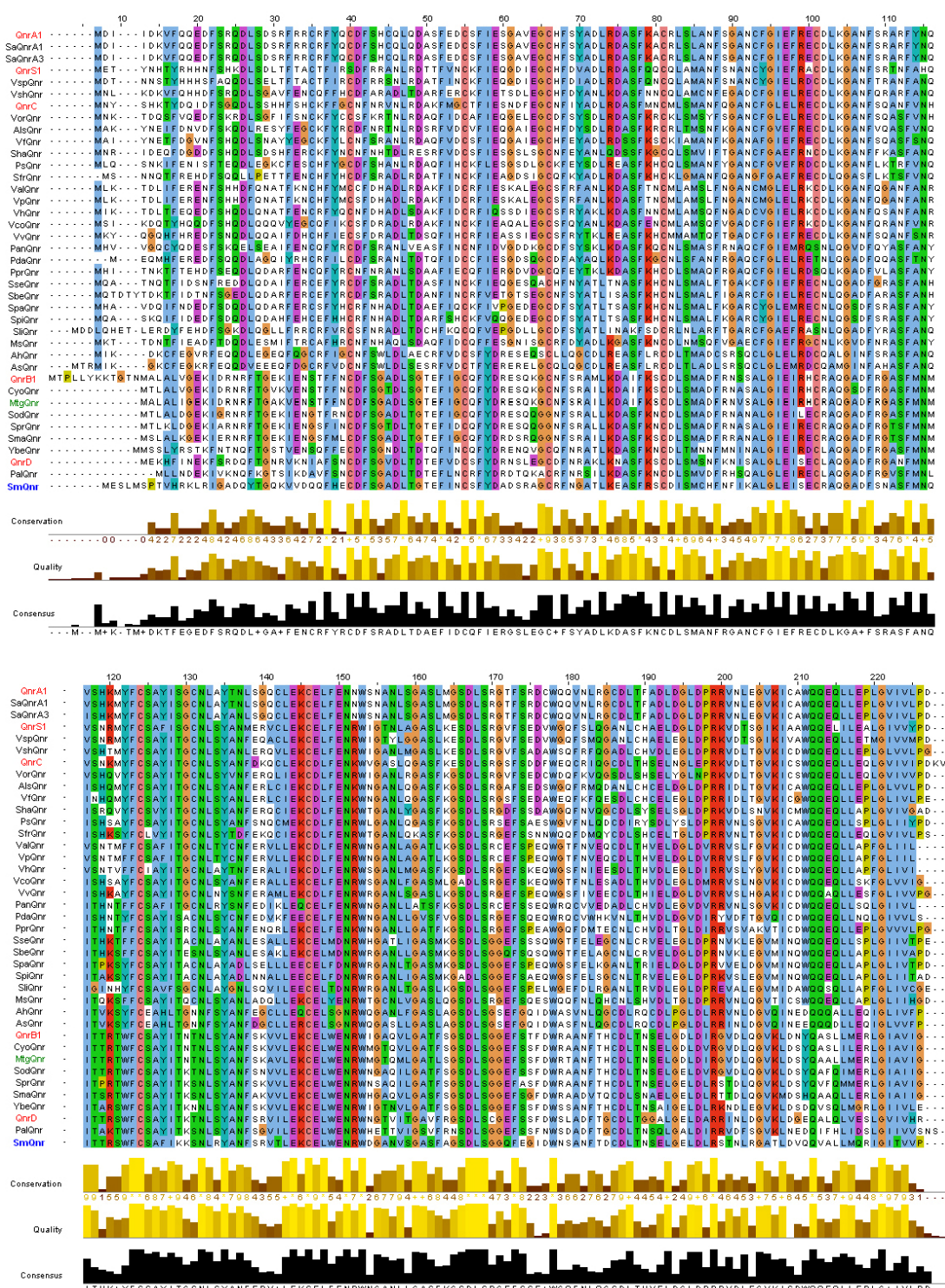


Figura 5. Alineamiento de las proteínas Qnr.

En el alineamiento se incluye solo un representante de cada grupo de las proteínas Qnr codificadas en plásmidos (en rojo). La posición de SmQnr se indica en azul y el resto de las proteínas Qnr cromosómicas en negro. En el alineamiento se ha añadido la proteína MtgQnr (en verde) hallada en una base de datos de metagenoma marino (ver 4.2.4).

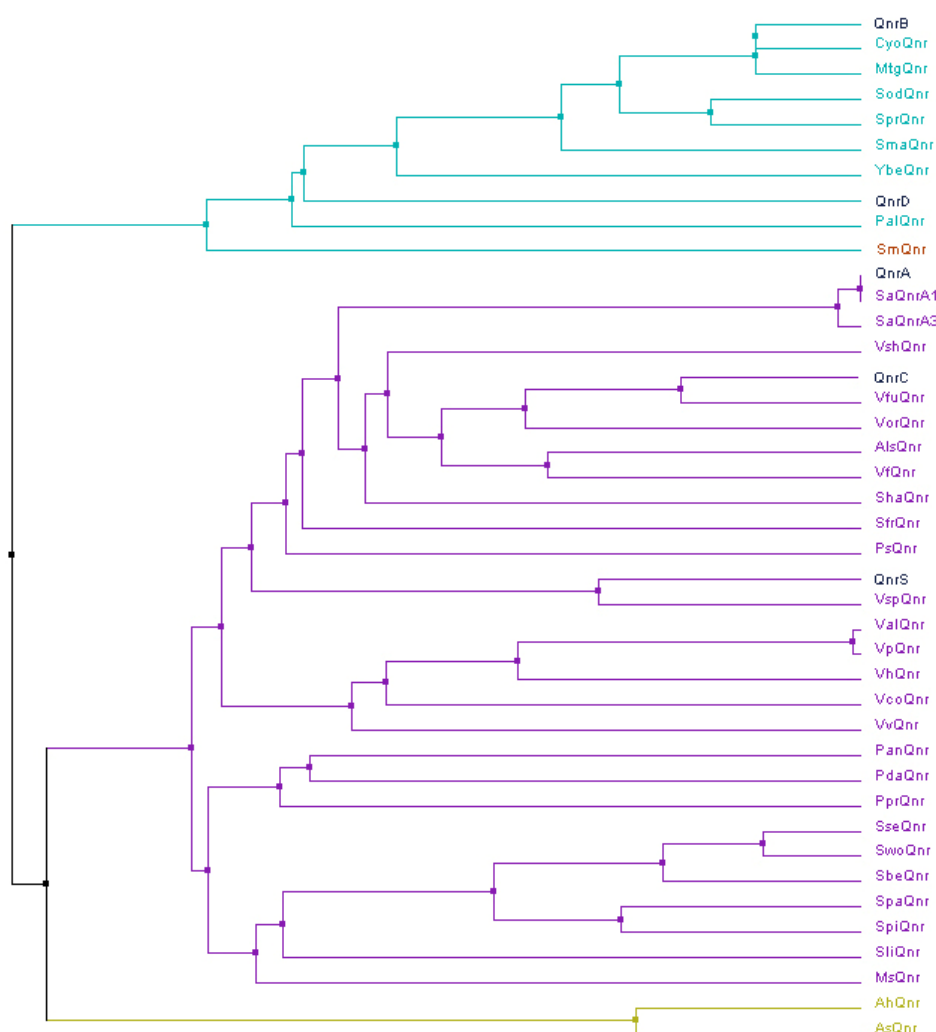


Figura 6. Árbol de identidad de las proteínas Qnr plasmídicas y cromosómicas.

Según su identidad las proteínas Qnr se agrupan en 3 ramas. La primera (en azul) contiene las QnrB y QnrD plasmídicas y las QnrB-like cromosómicas de bacterias como *Serratia* o *Stenotrophomonas* (en naranja). La segunda rama (en morado) contiene las proteínas plasmídicas QnrA, QnrC y QnrS, además de las proteínas Qnr codificadas en los cromosomas de *Vibrio*, *Shewanella* o *Photobacterium*. En una tercera rama (en verde) estarían las 2 proteínas Qnr codificadas en los genomas de *Aeromonas*. Las proteínas Qnr codificadas en plásmidos están marcadas en negro.

Con el propósito de estudiar si estos genes *qnr* cromosómicos eran resultado de una adquisición reciente por HGT se analizaron los entornos génicos de todos ellos. Los resultados de estos análisis indican que el entorno dentro de los géneros *Aeromonas*, *Shewanella* o *Vibrio* es muy similar, lo que descarta una adquisición reciente (ver Figura 7). El entorno génico de *Smqnr* en las 3 cepas de *S. maltophilia* analizadas también está conservado.

Aeromonas hydrophila (CG)*A. salmonicida* (CG)*Moritella* sp. (WGS)*Photobacterium damsela* (WGS)*P. profundum* (CG)*P. angustum* (WGS)*Providencia alcalifaciens* (WGS)*Serratia proteomaculans* (CG)*S. odorifera* (WGS)*Shewanella frigidimarina* (CG)*S. sediminis* (CG)*S. benthica* (WGS)*S. pealeana* (CG)*S. woodyi* (WGS)*S. halifaxensis* (CG)*S. loihica* (CG)*S. piezotolerans* (CG)

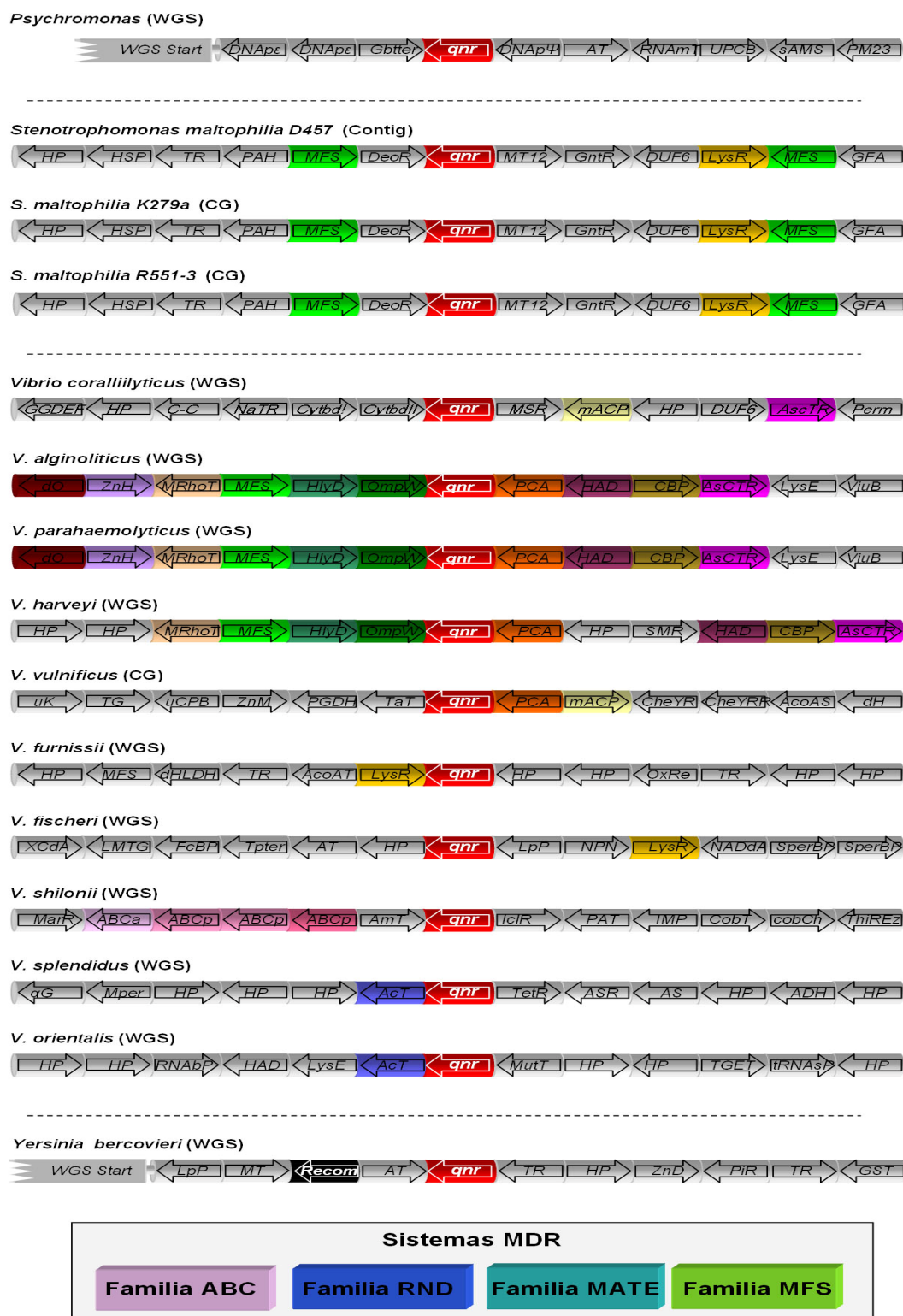


Figura 7. Análisis de los entornos génicos de los genes *qnr-like* codificados en cromosomas.

Los genes conservados y los sistemas MDR próximos a los genes *qnr-like* (en rojo) se han coloreado. También se han destacado (en negro) elementos que pudieran contribuir a transferencia horizontal de los genes *qnr-like* cromosómicos. CG y WGS indica si los entornos se han obtenido de un genoma completo secuenciado o de *Whole Genome Shotguns*, respectivamente. Las abreviaciones de los nombres de los genes se muestran en el Anexo 1.2.

4.2.4. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE GENES *qnr* EN METAGENOMAS AMBIENTALES

Considerando la posibilidad de encontrar genes *qnr* o *qnr-like* en especies no cultivables se analizaron bases de datos de metagenomas ambientales (ver materiales y métodos 3.4.5). Únicamente se encontraron genes similares a *qnr* en la base de datos del Mar de los Sargazos (*Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea* (Venter et al., 2004)), entre ellos apareció un gen nuevo que hemos denominado *Mtgqnr* que codifica una proteína con una identidad de 94,9 % y una similitud de 99,5% con la proteína plasmídica *QnrB5*.

```

QnrB5  MTLALVGEKIDNRNFTGEKVENSTFFNCDFSGADLSGTEFIGCQFYDRESQKGCNFSRAMLKDAIFKSCDLS
      :.....: :.....: :.....: :.....: :.....: :.....: :.....: :.....: :.....:
MtgQnr MALALIGEKIDNRNFTGAKVENSTFFNCDFSGADLSGTEFIGCQFYDRESQKGCNFSRAILKDAIFKSCDLS

QnrB5  MADFRNVSALGIEIRHCRAQGADFRGASFMMITTRTWFC SAYITNTNLSYANFSKVLEKCELWENRWMGT
      :.....: :.....: :.....: :.....: :.....: :.....: :.....: :.....: :.....:
MtgQnr MADFRNVSALGIEIRHCRAQGADFRGASFMMITTRTWFC SAYITNTNLSYANFSKAVLEKCELWENRWMGT

QnrB5  QVLGATFSGSDLSGGEFSTFDWRAANFTHCDLTNSELGDLDIRGVDLQGVKLD SYQASLLMERLGIAIIG
      :.....: :.....: :.....: :.....: :.....: :.....: :.....: :.....: :.....:
MtgQnr QMLGATLSGSDLSGGEFSSFDWRTANFTHCDLTNSELGDLDIRGVDLQGVKLD SYQAALLMERLGIAVIG

```

Figura 8. Alineamiento de la proteína plasmídica *QnrB5* y *MtgQnr*.

Un punto indica que los aminoácidos alineados son similares, 2 puntos que son idénticos.

La aparición de una proteína *QnrB* en bases de datos de metagenoma marino, junto a la confirmación de la funcionalidad de las proteínas *QnrB* codificadas en los cromosomas de *S. maltophilia* y *S. marcescens*, *SmQnr* (Sanchez et al., 2008) y *SmaQnr* (Velasco et al., 2009) respectivamente, sugiere que al igual que en el caso de *qnrA*, los genes *qnrB* de origen plasmídico podrían tener su reservorio natural en bacterias acuáticas.

4.2.5. PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE *SmQnr*

La estructura de *SmQnr* se predijo combinando *template based* y predicción *ab initio* usando el servidor de predicción de estructuras de proteínas *ROBETTA* (ver materiales y métodos 3.4.8). El modelo originado muestra que la proteína se plegaría formando una estructura tubular hueca flanqueada por 2 α -hélices. Cada pentapéptido de *SmQnr* daría lugar a una lámina β que se uniría a la lámina

posterior mediante un giro de 90° de manera que cada 4 pentapéptidos se da una vuelta completa (ver Figura 9).

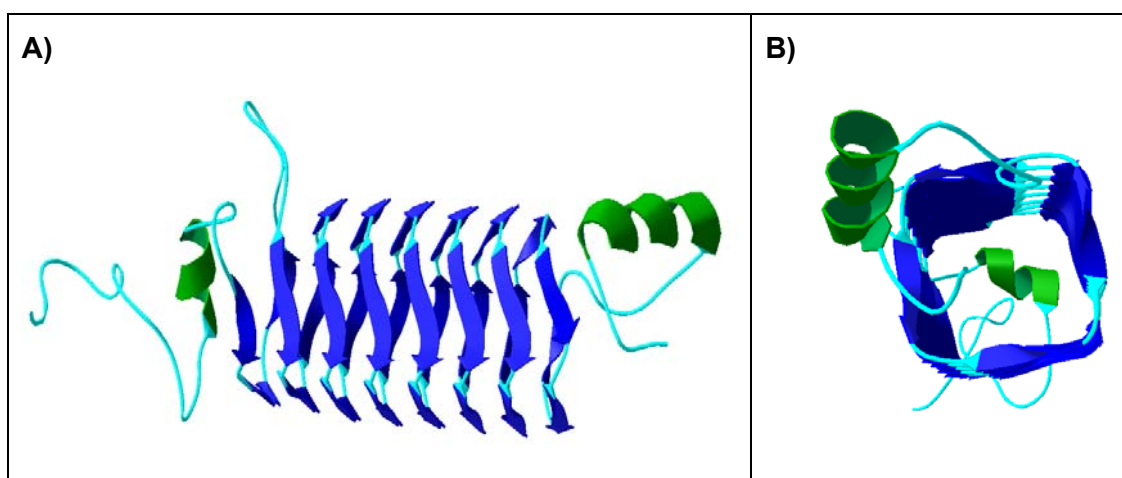


Figura 9. Predicción de la estructura SmQnr.

A) Vista lateral de SmQnr. Cada β -hélice esta formada por un pentapéptido, en los extremos se aprecian las 2 α -hélices. B) Vista frontal de SmQnr. Visualización con *Swiss-PdbViewer*.

Esta estructura de β -hélice es muy similar a la de la proteína de la MfpA de *Mycobacterium tuberculosis*, otra proteína que presenta repeticiones de pentapéptidos y cuya estructura ya ha sido resuelta (Hegde et al., 2005). MfpA forma dímeros mediante la unión de una α -hélice que presentan los monómeros en su extremo C-terminal. Debido a la forma, el tamaño y la disposición de cargas negativas en la superficie de MfpA se ha sugerido que el dímero asemeja un fragmento de ADN de doble cadena de 30 pb. La forma y la disposición teórica de las cargas en la superficie de SmQnr (ver Figura 10) es similar a MfpA, sin embargo, la presencia de una α -hélice en cada uno de sus extremos de la estructura de SmQnr le podría permitir no solo dimerizar sino multimerizar debido a una sucesión de uniones entre las hélices C-terminal y N-terminal de distintos monómeros lo que daría lugar a una estructura similar a un fragmento de ADN de mayor tamaño que el que asemejaría MfpA.

Estas similitudes entre SmQnr y MfpA podrían dar una explicación del descenso de sensibilidad a quinolonas en presencia de SmQnr. SmQnr competiría con el ADN en la unión a la girasa formando un complejo GyrA-SmQnr al que se unirían las quinolonas.

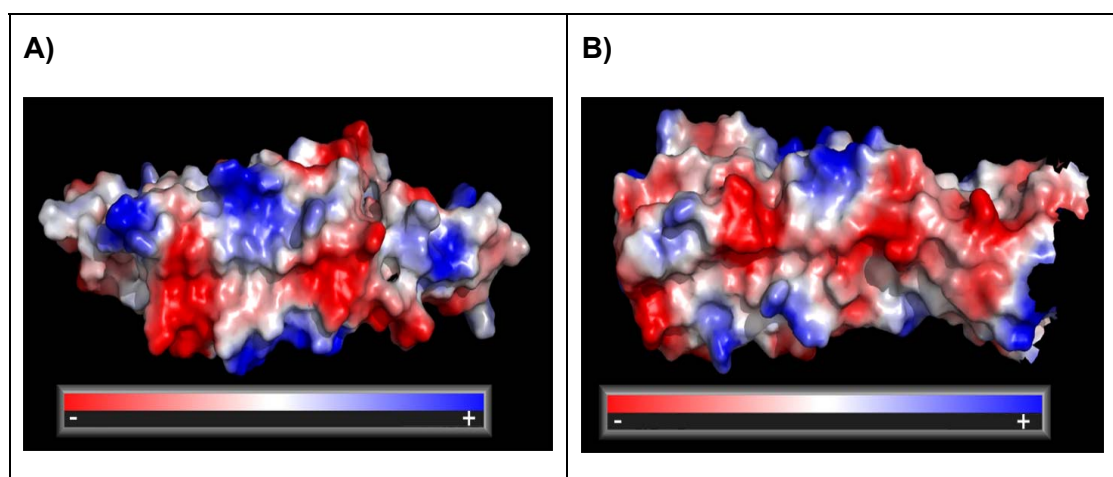


Figura 10. Comparación de cargas superficiales de SmQnr (A) y MfpA (B).

En las 2 proteínas se aprecia un surco electronegativo rodeado de algunos residuos cargados positivamente. La estructura cristalizada de MfpA es un dímero, en esta imagen la mayoría de residuos del monómero B de MfpA no se muestran para facilitar la comparación con el monómero de SmQnr. Las cargas negativas están en rojo y las positivas en azul. El cálculo de las cargas y la visualización fueron realizadas con PyMol.

4.3. ANALISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE SmeT

4.3.1. CLONAJE Y PURIFICACIÓN DE SmeT

La proteína SmeT fue purificada por cromatografía de afinidad (véase sección materiales y métodos 3.7.1) usando el sistema IMPACT-CN (NEB) (Chong et al., 1998) de purificación de proteínas. Dicho sistema permite la expresión de proteínas como proteínas de fusión a inteína y a un CBD (*Chitin Binding Domain*). El dominio CBD posibilita la unión por afinidad a una columna con quitina y la inteína es capaz de mover la proteína a purificar (SmeT) desde el enlace peptídico que forma con ella hasta la cadena lateral de la cisteína que está en su N-terminal. El nuevo enlace tioéster creado se rompe con tioles, como DTT, y la proteína a purificar se libera de la columna. El gen *smeT* fue clonado en el plásmido pTYB1, entre los sitios de restricción *SapI* y *NdeI*, lo que permitió la elución de SmeT con su secuencia nativa, es decir sin residuos extra en su composición.

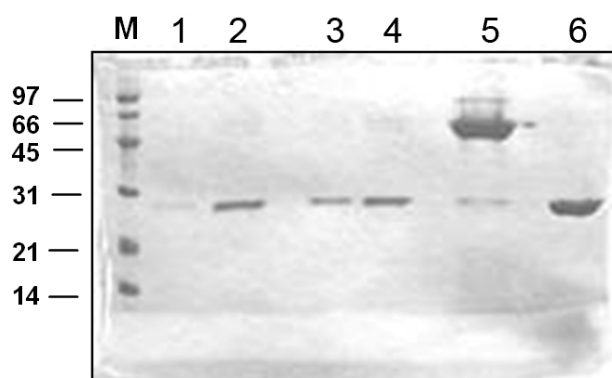


Figura 11. Purificación de SmeT.

SmeT fue expresada como una proteína de fusión a inteína y purificada según el sistema IMPACT-CN (NEB). Tras cortar con DTT, la proteína eluída (carriles 1, 2, 3, 4 y 6) fue analizada en un 12% SDS-PAGE para verificar la purificación de una proteína de un peso molecular similar al de SmeT (24.6 kDa). En el mismo gel se analizaron las proteínas retenidas en la columna (carril 5) cuyos tamaños corresponderían a inteína (55 kDa), la proteína de fusión SmeT-inteína (80 kDa) y SmeT (24.6 kDa), aunque esta última podría deberse a que el uso de mercaptoetanol en el tampón de carga provoca la ruptura de la fusión SmeT-inteína. A la izquierda se indican los pesos moleculares de las proteínas que componen el marcador (M).

Durante este trabajo también se intentó purificar el alelo mutado de la proteína SmeT que aparece en la cepa *S. maltophilia* D457R y que es incapaz de reprimir la expresión de la bomba SmeDEF. Tras la clonación y expresión usando el sistema IMPACT-CN la purificación no fue posible ya que la proteína mutada agregaba formando cuerpos de inclusión. La purificación de la proteína de fusión en condiciones desnaturalizantes también fue imposible. Todo esto sugiere que los

cambios estructurales producidos al mutar L166 a Q166 provocan a su vez una modificación importante en las propiedades de la proteína que dan cuenta de su pérdida de funcionalidad.

4.3.2. OLIGOMERIZACIÓN DE SmeT

La proteína purificada SmeT fue cargada en un gel de poliacrilamida con SDS y su presencia fue localizada por Western blot (ver sección materiales y métodos 3.7.3) con un anticuerpo anti-SmeT (Figura 12). Aunque la electroforesis no era de tipo nativo, se detectaron dos bandas cuyas masas moleculares estarían cercanas a las de un dímero y un monómero de SmeT. La capacidad de SmeT de formar dímeros que sugiere este experimento fue demostrada al resolver la estructura de la proteína (4.3.3).

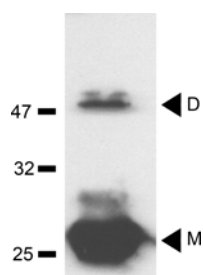


Figura 12. Oligomerización de SmeT.

El análisis por Western blot de SmeT en un 8% SDS-PAGE, mostró que la proteína da lugar a dos bandas: una de cerca de 25 kDa y otra de aproximadamente 50 kDa, demostrando la tendencia de la proteína a formar dímeros. Los valores numéricos corresponden a los marcadores de masa molecular. M: monómero, D: dímero

4.3.3. CRISTALIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE SmeT

Los datos de difracción de cristales de SmeT, purificada en su forma nativa (ver materiales y métodos 3.7.1), permitieron la resolución de la estructura de la proteína (Figura 13), con una resolución de 2.0 Å (Hernandez et al., 2009). La cristalización de SmeT fue realizada en colaboración con María Jesús Maté y Antonio Romero (CIB-CSIC).

Como en otros miembros de la familia TetR, SmeT cristaliza formando homodímeros. Cada monómero está formado por 9 α -hélices y el dímero se mantiene fundamentalmente mediante fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno y de sal que se establecen entre las hélices α -8 y α -9 de las dos subunidades. En la estructura de cada unidad se pueden

distinguir 2 dominios; las 3 hélices del extremo N-terminal forman el dominio de unión al ADN ($\alpha 2$ y $\alpha 3$ el dominio *HTH*), y las otras 6 conforman el bolsillo de unión al efector y la región de dimerización.



Figura 13. Estructura de SmeT.

SmeT cristaliza como un dímero. Cada subunidad se pliega formando 9 α -hélices. Las hélices α -1, α -2 y α -3 forman el dominio de unión a ADN (en morado). Las hélices centrales (α -4, α -5, α -6, α -7 y α -8) forman el bolsillo de unión al efector (rojo). El dímero se mantiene por interacciones entre las hélices α -8 y α -9 (naranja) de las 2 subunidades.

En esta primera estructura de SmeT la mayor parte del dominio de unión a ADN del monómero B no pudo ser resuelto. Esto podría deberse a que para el funcionamiento de SmeT, como para el de otras proteínas TetR (Ramos et al., 2005), se requiere cierta movilidad del dominio HTH de forma que es este movimiento el que posibilita la unión-desunión de la proteína a su ADN operador. En el monómero A, la presencia de una molécula, aún sin determinar, que aparece en el bolsillo de unión, estabilizaría su dominio HTH lo que habría permitido que, exceptuando ciertos residuos, el dominio de unión a ADN de este monómero si fuera visible.

En la formación del bolsillo de unión participan residuos de las hélices α -4, α -5, α -6, α -7 y α -8. Algunos de estos residuos (Phe-70, Met-93, Met-110, Met-113, Phe-133, y Met-140) son capaces de adoptar una doble conformación lo que permitiría acoplar múltiples sustratos. La presencia de residuos de carga positiva dentro del bolsillo de unión (His-67 e His-167), y su carácter hidrofóbico sugiere que los ligandos de SmeT son moléculas hidrofóbicas cargadas negativamente.

La mayor parte de la superficie de la proteína está cargada negativamente exceptuando el dominio de unión a ADN que tiene una ligera carga positiva debido a la contribución de los residuos Arg-45, His-27, Arg-31 e His-51. El dominio C-terminal y el N-terminal se mantienen próximos por interacciones hidrofóbicas que se establecen entre ciertos aminoácidos del inicio de α -4 (Val-58, Leu-59, e Ile-62) y las 3 hélices del dominio de unión a DNA. También Arg-65 (en α -6) tiene un papel fundamental en acercar los dominios C-terminal y N-terminal ya que establece interacciones iónicas con residuos de carga negativa de la hélice α -1.

4.3.4. IDENTIFICACIÓN DE LA SECUENCIA OPERADORA DE SmeT

La secuencia operadora de SmeT fue determinada mediante ensayos de *footprinting* con ADNasa I (ver materiales y métodos 3.11).

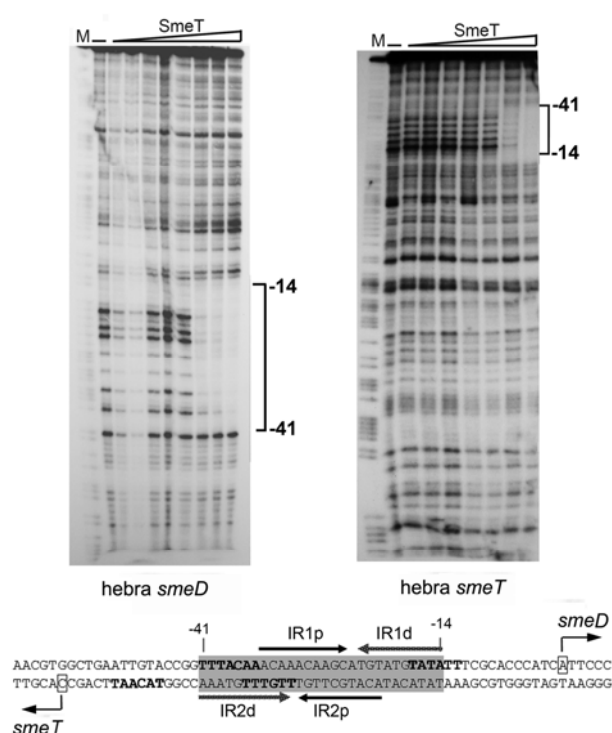


Figura 14. Identificación del sitio de unión de SmeT en la zona intergénica *smeD-smeT*.

La sonda con la región intergénica *smeD-smeT* fue incubada con concentraciones crecientes de SmeT y posteriormente digerida con ADNasa I. SmeT protege en ambas cadenas de ADN una zona pseudopalindrómica de 28 pb comprendida entre las posiciones -14 y -41 a partir del sitio de inicio de transcripción de *smeD*. Esta zona incluye 2 repeticiones invertidas (IR1 e IR2) que permitirían la unión de 2 dímeros de SmeT. Las repeticiones invertidas han sido llamadas p (proximal) o d (distal) dependiendo de su cercanía al centro de simetría del operón. Las regiones -10 y -35 de los promotores están marcadas en negrita y los inicios de transcripción en un rectángulo.

SmeT protegió de la actividad de la nucleasa una zona, dentro de la región intergénica *smeD-smeT*, de aproximadamente 30 pares de bases que contiene una secuencia pseudopalindrómica de 28 pb (Figura 14). Esta secuencia incluye las regiones -35 de los promotores de *smeT* y *smeD* y parte de la región -10 de *PsmeD* lo que posibilitaría la represión conjunta de los genes *smeT* y *smeD*.

4.3.5. ESPECIFICIDAD DE LA UNIÓN SmeT-REGIÓN INTERGÉNICA *smeD-smeT*

La especificidad de unión de SmeT a la región de 28 pb de la zona intergénica *smeD-smeT* que aparece protegida en los ensayos de *footprinting*, se demostró con ensayos de retardo en gel (ver materiales y métodos 3.8). Al incubar una sonda radioactiva de 30 pb (que contiene el operador) con SmeT aparecen dos bandas de retardo lo que sería indicativo de dos tipos de complejos SmeT-ADN. Cuando se añade sonda no marcada radiactivamente (competidor específico) las bandas retardadas se dejan de ver y el complejo SmeT-ADN no es visible por autorradiografía (Figura 15). Todas las incubaciones fueron hechas con exceso de ADN competidor no específico (Poli dl-dC) para corroborar la especificidad de la unión.

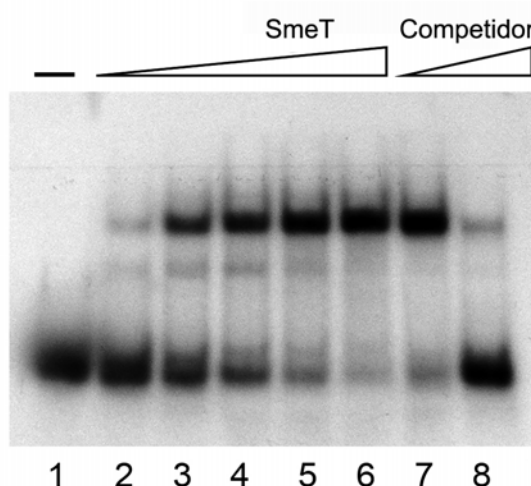


Figura 15. Unión específica de SmeT a la región intergénica *smeD-smeT*.

La sonda de 30 pb con el operador de SmeT fue marcada radiactivamente en su extremo 5' y posteriormente incubada con concentraciones crecientes (0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 y 3.2 μ M) de la proteína SmeT (carriles del 1 al 6 respectivamente). Los complejos se separaron en un gel no desnaturizante al 6% de poliacrilamida. Para corroborar la especificidad de la unión, se añadieron concentraciones crecientes (1 μ M y 10 μ M) de sonda de 30 pb no marcada al complejo preformado con la concentración de proteína más alta (3.2 μ M). Como se muestra en los carriles 7, 8, la adición de esta sonda específica impide la formación del complejo con la sonda marcada radiactivamente.

4.3.6. DETERMINACIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS FUNDAMENTALES PARA UNIÓN DE SmeT

Por ensayos de interferencia de radical hidroxilo se determinaron los nucleótidos más relevantes para la unión SmeT-ADN (ver materiales y métodos 3.12). La formación del complejo proteína / región intergénica no fue posible cuando la cadena que codifica la bomba SmeDEF carecía de los nucleósidos TGTATGT (Figura 16). Esta secuencia, que se localiza entre las posiciones -18 y -24 del sitio de inicio de transcripción de *smeD*, forma parte de la secuencia operadora de SmeT. En la cadena complementaria, que codifica *smeT*, el número de nucleótidos necesarios era mucho mayor, 18, si bien los 7 complementarios a los arriba mencionados parecen jugar el papel mas importante.

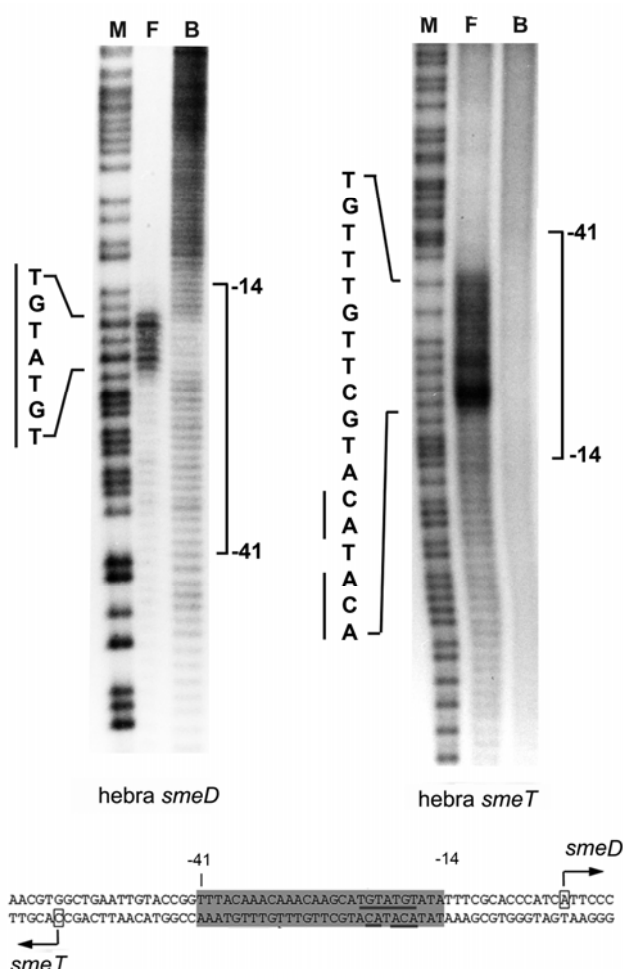


Figura 16. Nucleósidos críticos para la unión región intergénica / SmeT.

La sonda radiactiva, tratada con radicales hidroxilo de forma que sólo se eliminara un nucleósido por doble cadena de ADN, se incubó con SmeT. Los fragmentos de ADN no unidos a proteína (F) estaban enriquecidos en los nucleósidos situados entre las regiones -18 a -24 de la cadena que codifica la bomba. La región entre -14 y -41 protegida en los ensayos de footprinting se indica con un corchete. Los nucleósidos fundamentales están subrayados en el esquema del operón. M = Marcador, F = ADN no unido a SmeT, B = ADN unido a SmeT.

4.3.7. IMPORTANCIA DE LOS NUCLEÓTIDOS DISTALES DEL OPERADOR

Para estudiar la importancia de las zonas distales del operador en la unión SmeT-ADN se obtuvieron 3 sondas radioactivas de doble cadena de 30 pb (ver materiales y métodos 3.9). La primera, denominada Sonda Central, contenía los 28 pb que constituyen el operador mas un nucleótido de cada extremo. La segunda, Sonda Izquierda, estaba desplazada 9 nucleótidos a la izquierda de forma que tenía interrumpida la secuencia TGTATGT que había sido señalada por los ensayos de interferencia de radical hidroxilo como crítica para la unión de la proteína. La tercera, Sonda Derecha, estaba desplazada 9 nucleótidos hacia la derecha y tenía interrumpida la parte izquierda del operador (ver Figura 17).

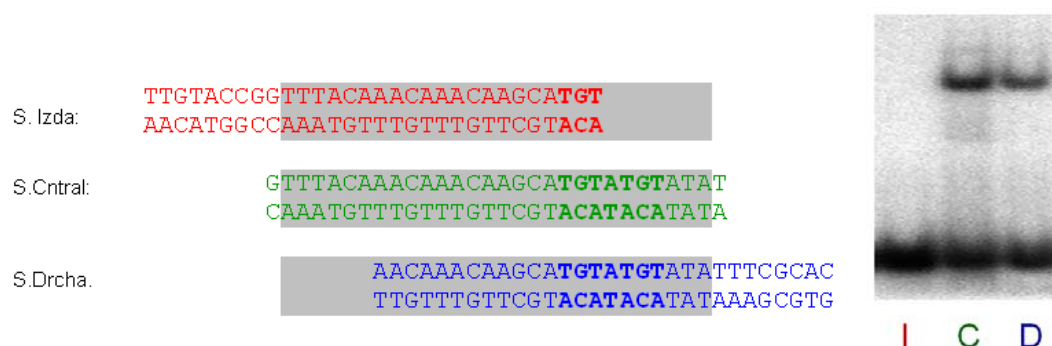


Figura 17. Importancia en la asimetría en el operador.

Las 3 sondas de doble cadena de 30 pb se incubaron con SmeT a una concentración de 0,8 μ M. Los complejos se separaron en un gel no desnaturizante al 6% de poliacrilamida. La Sonda Izquierda (I), que tenía interrumpida la secuencia TGTATGT, era incapaz de producir retardo a esta concentración de proteína. En los carriles donde SmeT se incubó con las Sonda Central (C) y Derecha (D) sí se observó retardo. El rectángulo gris indica la zona donde están los 28 pb del operador.

Los ensayos de retardo, realizados como está descrito en (3.9), demostraron que la sonda que tiene interrumpida la secuencia TGTATGT, es la única incapaz de producir retardo con una concentración de SmeT de 0,8 μ M. Esto confirma la importancia que tiene dicha secuencia para la unión de SmeT a su operador.

4.4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL SISTEMA SmeDEF EN RESPUESTA A EFECTORES

En la Introducción de esta tesis se comentó brevemente que la expresión de los sistemas MDR está en muchos casos inducida por determinadas moléculas que generalmente se unen a los reguladores transcripcionales locales provocando cambios en su estructura que acaban modificando la unión de la proteína a su ADN operador (Ramos et al., 2005). Los trabajos sobre la naturaleza de estos inductores apuntan a que lejos de lo que cabría esperar, los mejores efectores de la expresión de sistemas de bombeo múltiple de drogas no suelen ser antibióticos sino determinados compuestos naturales como flavonoides de origen vegetal (Brooun et al., 1999; Lewis, 2001; Teran et al., 2006).

Los experimentos de esta sección tienen por objeto estudiar si ciertas moléculas, que pueden aparecer tanto en el entorno natural (exudados de plantas) como en el entorno clínico (antibióticos y biocidas), son capaces de modificar el estado de unión SmeT a su operador. La ruptura del complejo SmeT-ADN desreprimiría la transcripción de la bomba SmeDEF incrementando la resistencia a antibióticos.

4.4.1. REGULACIÓN DE SmeDEF EN RESPUESTA A ANTIBIÓTICOS

La capacidad de determinados antibióticos de romper la unión SmeT-DNA se estudió *in vitro* mediante EMSA. La sonda de doble cadena de 30 pb que contenía el operador, sonda central, se incubó con la proteína y posteriormente se añadieron varios antibióticos que SmeDEF es capaz de expulsar (ver materiales y métodos 3.10). De los antibióticos usados, únicamente la tetraciclina fue capaz de hacer desaparecer la banda retardada (ver Figura 18), sin embargo, no estamos seguros del papel de la tetraciclina como efector de SmeT ya que este antibiótico no era capaz de romper el retardo en todos los EMSA realizados y se conoce su capacidad de unirse al ADN, lo que podría dar lugar a una deformación en el operador que a su vez provocaría la ruptura del complejo SmeT-ADN.

Además de los antibióticos antes mencionados se hicieron ensayos de EMSA con amikacina, imipenem, novobiocina, ácido nalidíxico y ampicilina (datos no mostrados) pero ninguno de estos otros antibióticos fue capaz de romper el complejo.

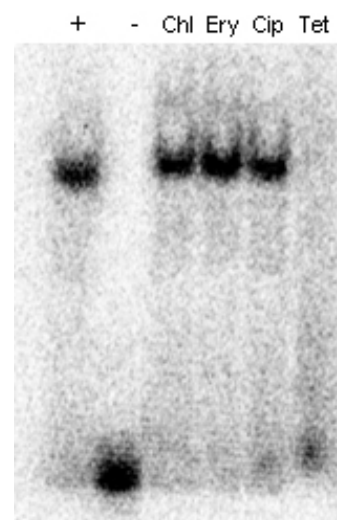


Figura 18. EMSA con antibióticos

El ADN operador se marcó con γ -[32P] (-) y se incubó con SmeT (+). Tras 20 minutos se añadieron los antibióticos a una concentración final de 3,2 mM. Solo la tetraciclina es capaz de romper el complejo de retardo SmeT-DNA. Chl= Cloranfenicol, Ery= Eritromicina, Cip= ciprofloxacina, Tet= tetraciclina.

Según estos resultados aunque SmeDEF es capaz de expulsar los antibióticos cloranfenicol, eritromicina, ácido nalidíxico y ciprofloxacina (Alonso and Martinez, 2000), ninguno de ellos provoca la desunión SmeT-DNA. Esto sugiere que la expresión del sistema MDR SmeDEF en *S. maltophilia* no se da en respuesta a estos antibióticos sino que su expulsión es colateral y en respuesta a la presencia intracelular de otras moléculas.

4.4.2. EXPRESIÓN DE SmeDEF EN RESPUESTA A BIOCIDAS

4.4.2.1. TRICLOSÁN, HEXACLOROFENO Y CLORURO DE BENZALCONIO ROMPEN LA UNIÓN SmeT-ADN

Trabajo previo en nuestro grupo había demostrado que la bomba SmeDEF es capaz de expulsar el biocida triclosán (Sanchez et al., 2005). Mediante EMSA se determinó la capacidad del triclosán y otros 2 biocidas (hexaclorofeno y cloruro de benzalconio) de romper, *in vitro*, la unión SmeT-ADN. La sonda central se incubó con la proteína y posteriormente se añadieron concentraciones crecientes de los 3 posibles inductores (ver materiales y métodos 3.10). A diferencia de los resultados de EMSA con antibióticos, los 3 biocidas eran capaces de provocar la ruptura del complejo de retardo, siendo el más eficaz el hexaclorofeno, seguido del triclosán y del cloruro de benzalconio (ver Figura 19).

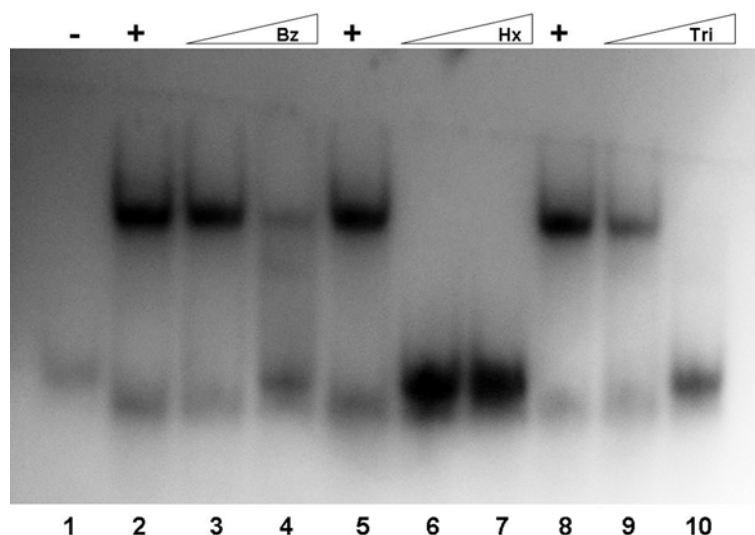


Figura 19. Ensayos de retardo en gel con biocidas.

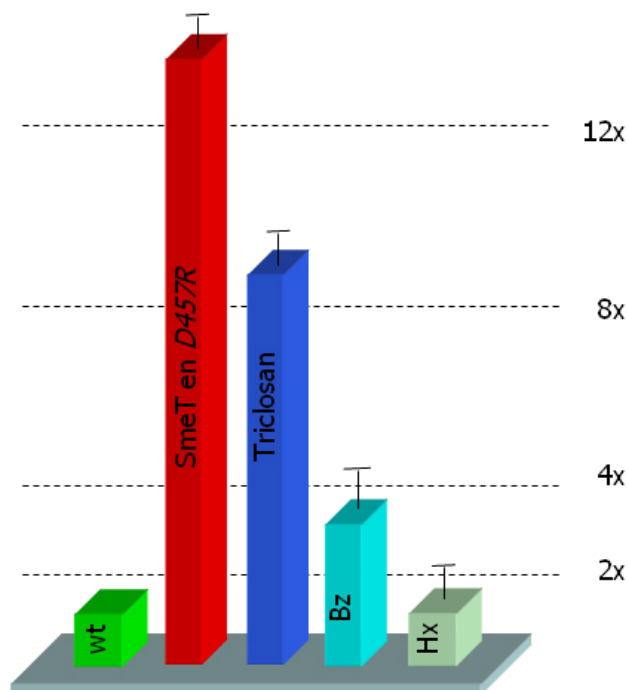
El ADN operador de SmeT se marcó con γ -[32P] (carril 1) y se incubó con 0.2 μ M SmeT (carriles 2, 5 y 8). Tras 20 minutos se añadieron concentraciones crecientes de los biocidas (0,1 mM y 0,2 mM). Los 3 biocidas son capaces de provocar la ruptura del complejo de retardo SmeT-DNA. Bz = Cloruro de benzalconio, Hx = Hexaclorofeno, Tri = triclosán.

4.4.2.2. AUMENTO DE LOS NIVELES DE ARNm DE *smeD* EN PRESENCIA DE BIOCIDAS

Para determinar si la ruptura de complejo represor SmeT-DNA operador que se observaba en los retardos con biocidas daba lugar, *in vivo*, al aumento de la transcripción de la bomba SmeDEF se midieron, por RT-PCR en tiempo real, los niveles de ARNm de *smeD* en presencia o en ausencia de los biocidas y se compararon con los niveles en el mutante multirresistente *S. maltophilia* D457R que sobreexpresa la bomba (ver materiales y métodos 3.6). La cantidad de ARNm de *smeD* en el mutante D457R era 13,7 veces (SEM \pm 0,30) mayor que en la cepa silvestre y las bacterias que crecían en medio con triclosán o cloruro de benzalconio también tenían aumentada la transcripción de *smeD* en 8.7 veces (SEM \pm 0,38) y 3,09 veces (SEM \pm 0,56), respectivamente. Sin embargo las variaciones en presencia de hexaclorofeno, a pesar de que este biocida era el mas eficaz a la hora de romper el retardo (ver Figura 19), no fueron significativas (1,1 veces, SEM \pm 0,56). Los datos aquí expresados son la media de los resultados de 3 extracciones de ARNm independientes (ver Figura 20).

Figura 20. Niveles de *smeD* en presencia de biocidas.

Por RT RT-PCR se midieron los niveles de ARNm de *smeD* en la cepa silvestre *S. maltophilia* D457 en ausencia y presencia de los 3 biocidas, y en el mutante D457R que sobreexpresa la bomba SmeDEF. La cantidad de transcrito era 13,7 veces mayor en el mutante que en la cepa silvestre. También se observó incremento de la expresión en presencia de triclosán (8.74 veces) y cloruro de benzalconio (3,09 veces) pero no en presencia de hexaclorofeno (1,15 veces).



El aumento de ARNm de *smeD* en presencia de triclosán y cloruro de benzalconio concuerda con los resultados de los ensayos de retardo (4.4.2.1) y apunta a que estos 2 biocidas son inductores reales de la expresión de la bomba SmeDEF. Por el contrario, la no variación de los niveles de ARNm de *smeD* con hexaclorofeno sugiere que la desunión SmeT-ADN en presencia de este biocida que se observa en los ensayos *in vitro*, no se llega a dar en el interior de la bacteria.

4.4.2.3. EFECTO DE LOS BIOCIDAS EN LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS EN *S. maltophilia*

Basándonos en los resultados de los retardos y de las RT RT-PCRs que demuestran que los 3 biocidas antes mencionados son capaces de separar SmeT de su ADN operador, y que en presencia de triclosán y cloruro de benzalconio existe una mayor transcripción de *smeD*, realizamos ensayos de antagonismo (ver materiales y métodos 3.3.1) con el objeto de estudiar si la sobreexpresión de SmeDEF inducida por biocidas conlleva un aumento en las CMI de los antibióticos que expulsa la bomba. Para estos experimentos se utilizó ciprofloxacina ya su CMI en el mutante D457R es 8 veces mayor que en la cepa silvestre (Sanchez et al., 2005) y por tanto los cambios de CMI en presencia de biocidas serían mas fácilmente apreciables.

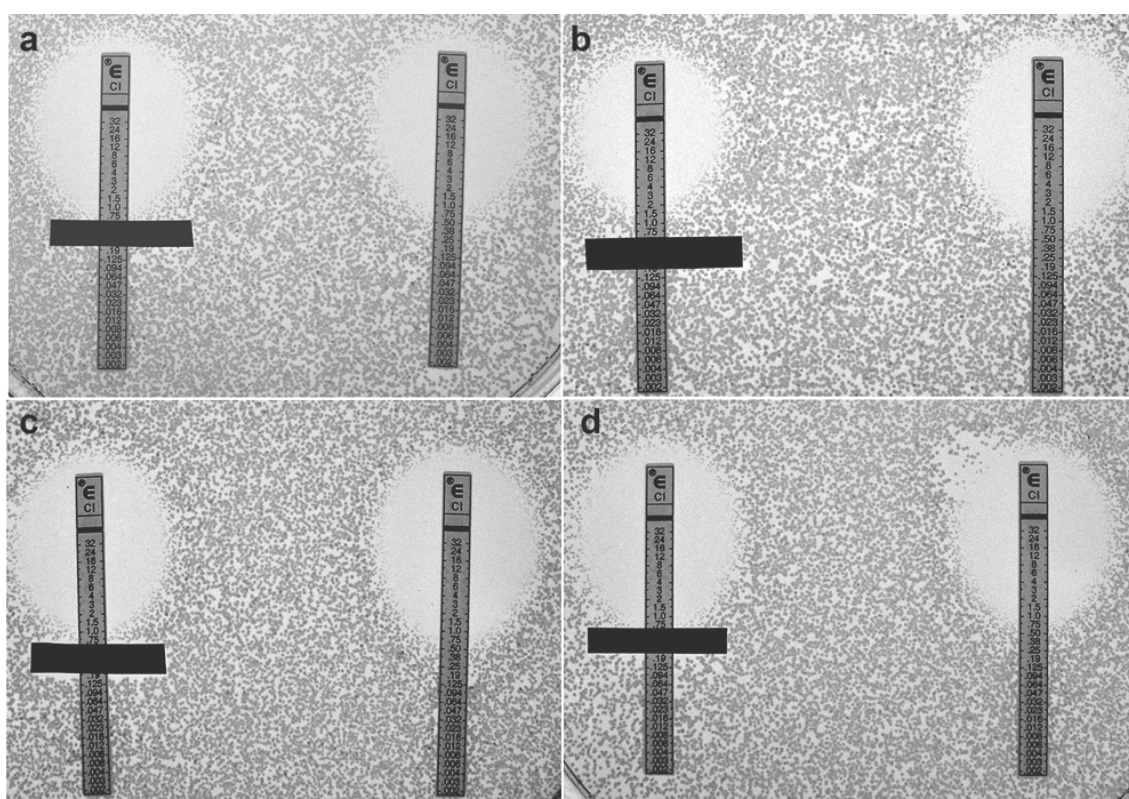


Figura 21. Estudios de antagonismo con biocidas y ciprofloxacina.

Una dilución de un cultivo en fase estacionaria de *S. maltophilia* D457 se creció durante 24 h a 37 °C en placas de MH agar que contenían 2 tiras de Etest® con ciprofloxacina. En las tiras de la izquierda se añadió, por debajo del valor de CMI, otra tira de papel Whatman® que contenía etanol (a) o concentraciones subinibitorias de los biocidas triclosán (b), cloruro de benzalconio (c) y hexaclorofeno (d). Los valores de CMI de aquellas bacterias creciendo próximas a triclosán y cloruro de benzalconio aumentaban a 2 µg/ml y 1,5 µg/ml, respectivamente. La presencia de hexaclorofeno o etanol no hacía variar la CMI de ciprofloxacina (0,75 µg/ml).

Los resultados de este ensayo (ver Figura 21) muestran que las bacterias próximas a las tiras de papel Whatman® con triclosán o cloruro de benzalconio eran capaces de crecer con concentraciones más altas de antibiótico (2 µg/ml y 1,5 µg/ml, respectivamente) que en ausencia del biocida (0,75 µg/ml). Las bacterias que crecían cercanas al hexaclorofeno presentaban la misma CMI que sin efector (0,75 µg/ml).

Estos resultados están de acuerdo con los datos obtenidos por EMSA (4.4.2.1) y RT RT-PCR (4.4.2.2) que indicaban que el triclosán y el cloruro de benzalconio son capaces de desunir SmeT de su operador e iniciar la expresión de la bomba SmeDEF. La mayor expresión de la bomba implicaría unos valores de CMI más

altos de los antibióticos que expulsa. La presencia del hexaclorofeno, que no induce la sobreexpresión de la bomba, no da lugar a cambios de CMI.

4.4.2.4. CURVAS DE CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE TRICLOSÁN Y ANTIBIÓTICOS EXPULSADOS POR LA BOMBA SmeDEF

Mediante curvas de crecimiento se estudió el efecto que el triclosán tiene sobre *S. maltophilia* D457 cuando crece con concentraciones de antibiótico inferiores a su CMI (ver materiales y métodos 3.3.3). Al igual que en el apartado anterior los antibióticos elegidos fueron las quinolonas dado que la sobreexpresión de la bomba provoca un aumento de CMI de al menos 8 veces. Las curvas (ver Figura 22) muestran que cuando hay antibióticos en el medio, la presencia del biocida supone una ventaja, seguramente debido a que SmeDEF está expresada y las quinolonas son expulsadas.

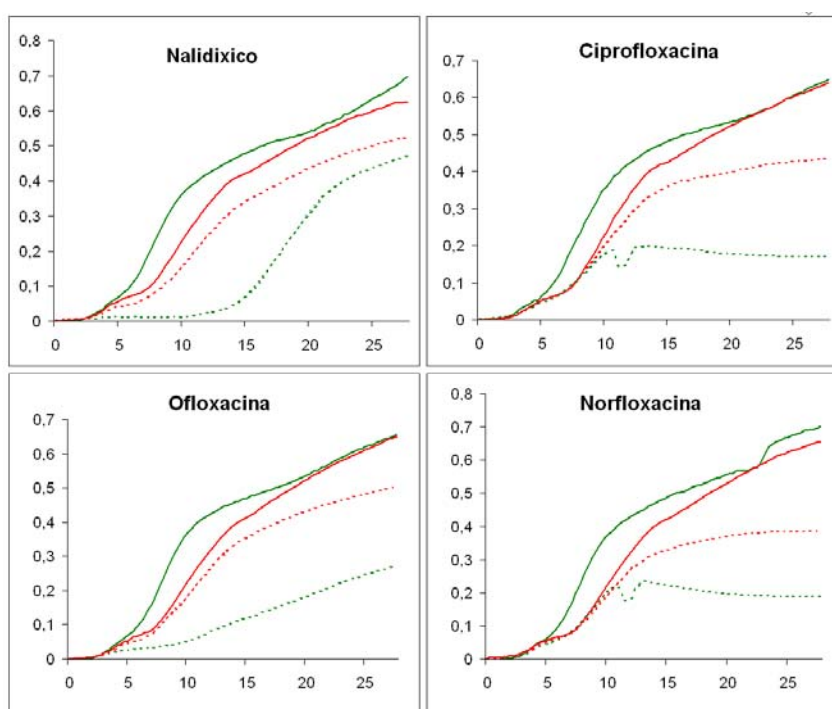


Figura 22. Curvas de crecimiento en presencia de antibióticos y triclosán.

Las curvas de crecimiento de *S. maltophilia* D457 en ausencia de antibióticos (líneas continuas) muestran que el crecimiento en presencia de triclosán (rojo) es mas lento que sin él (verde). Sin embargo, cuando se añaden antibióticos al medio (líneas punteadas) la presencia del biocida supone una ventaja para las bacterias. Las concentraciones usadas para cada antibiótico fueron: 6 µg/ml de ácido nalidixico, 1 µg/ml de ofloxacina, 6 µg/ml de norfloxacina y 1 µg/ml de ciprofloxacina.

4.4.2.5. ESTRUCTURA DE SmeT UNIDO A TRICLOSÁN.

En colaboración con Federico Martín y Antonio Romero (CIB-CSIC) hemos conseguido resolver la estructura de SmeT unido al biocida Triclosán (ver Figura 23). En esta cristalización, la presencia de 2 moléculas de triclosán en el monómero B estabiliza el dominio de unión a ADN y ha permitido visualizar los residuos del dominio HTH no visibles en la cristalización que se había realizado en ausencia de efector (ver Figura 13).

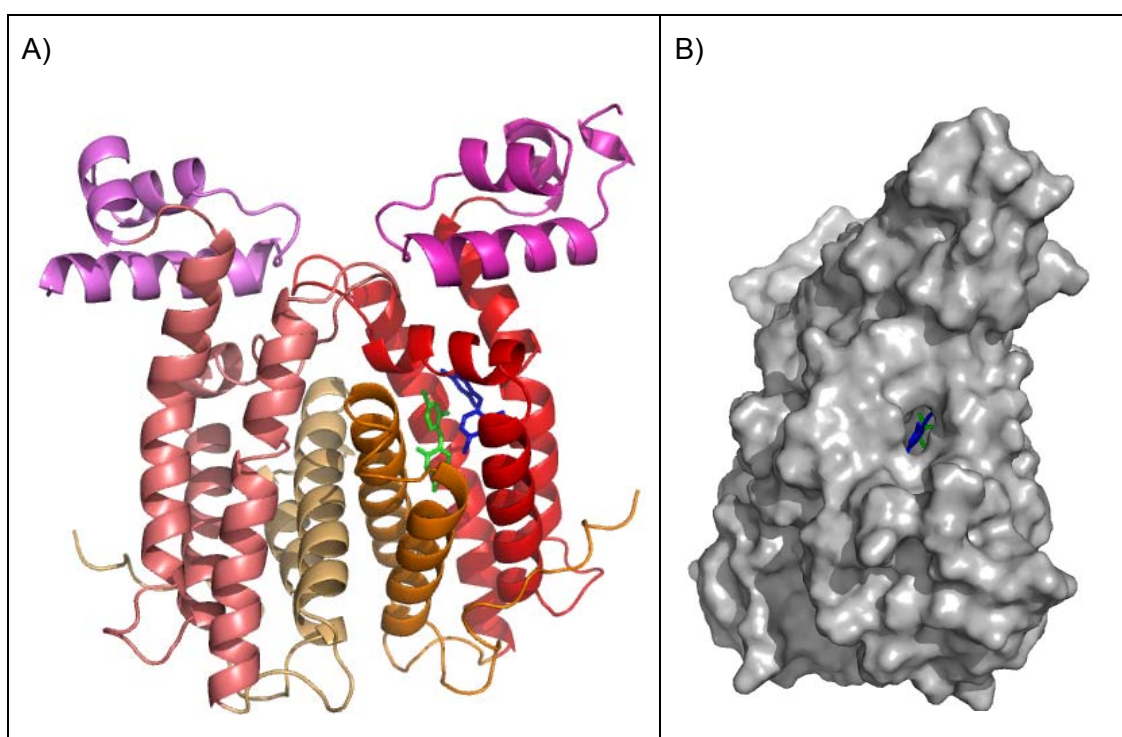


Figura 23. Estructura de SmeT unida al biocida triclosán

A) Representación en modo *cartoon* de SmeT unido a 2 moléculas de triclosán. B) Representación en modo *surface* del complejo SmeT-triclosán. Se puede observar uno de los 2 canales de entrada al bolsillo de unión y las 2 moléculas de triclosán dentro. Una molécula de triclosán está en azul y la otra en verde

Este complejo SmeT-efector es la base del mecanismo de expulsión de antibióticos por SmeDEF en presencia de triclosán en *S. maltophilia*. Aunque hay algunos estudios que demuestran que el triclosán es sustrato de los sistemas MDR (Chuanchuen et al., 2002; Gotoh et al., 1995; Poole, 2001), esta es la primera vez que se le describe como efector de un regulador transcripcional de bombas de expulsión de drogas y la primera prueba estructural de ello.

4.4.3. EXPRESIÓN DE SmeDEF EN RESPUESTA A EXUDADOS DE PLANTAS Y ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO

4.4.3.1. ALGUNOS EXUDADOS DE PLANTAS ROMPEN LA UNIÓN SmeT-ADN

Como ya se comentó en la Introducción, diversos autores han descrito el papel inductor que ciertos exudados de plantas juegan sobre la expresión de sistemas MDR (Alguet et al., 2007; Lewis, 2001; Randall and Woodward, 2002). Mediante EMSA hemos tratado de analizar si estas moléculas son capaces, *in vitro*, de romper la unión de SmeT al ADN. Para estos ensayos de retardo, SmeT se incubó con una sonda de ADN de doble cadena de 158 pb que contenía el operador. Posteriormente se añadieron los exudados de plantas (ver materiales y métodos 3.10). La hormona vegetal ácido salicílico y los flavonoides naringenina, fletina, cumestrol, genisteína, apigenina, y quercetina son capaces de provocar la ruptura del complejo de retardo (ver Figura 24).

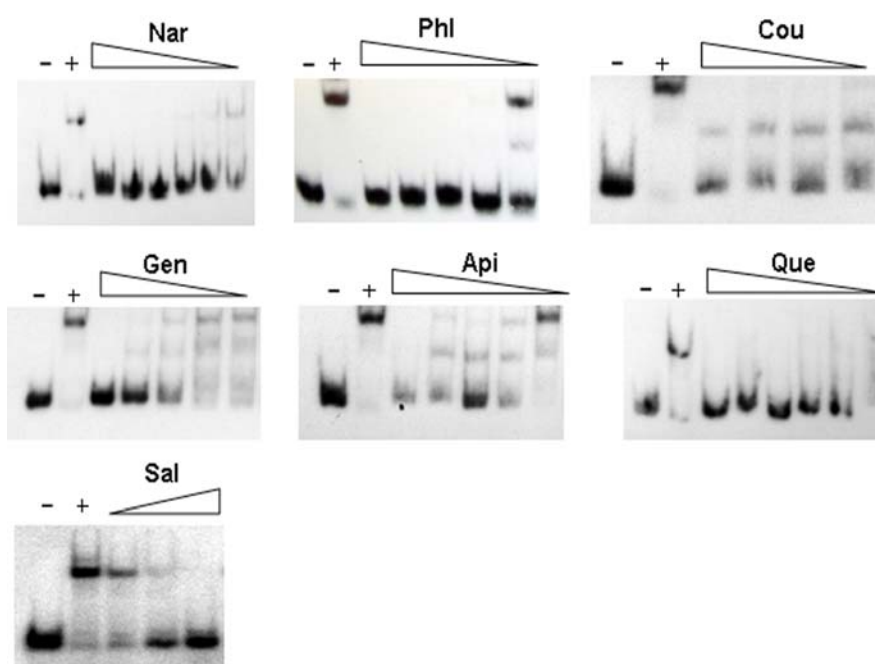


Figura 24. Ensayos de retardo en gel con exudados de plantas.

La sonda de doble cadena de 158 pb que contenía el operador de SmeT se incubó con la proteína. Posteriormente se añadieron concentraciones crecientes de los exudados de plantas hasta un máximo de 2 mM. Los flavonoides naringenina (Nar), fletina (Phi), cumestrol (Cou), genisteína (Gen), apigenina (Api) y quercetina (Que), y la hormona vegetal ácido salicílico (Sal) son capaces de provocar la ruptura del complejo de retardo SmeT-DNA.

En estos ensayos también se estudió el papel de la berberina y del ácido acetil salicílico como efectores de SmeT. La berberina es un alcaloide de origen vegetal

con un rol demostrado como inductor de la expresión de sistemas MDR bacterianos (Lewis, 2001), y el ácido acetil salicílico es un derivado del ácido salicílico de uso muy habitual. Sin embargo, ninguna de estas 2 moléculas fue capaz de romper el retardo (datos no mostrados).

4.4.3.2. AUMENTO DE LOS NIVELES DE ARNm DE *smeD* EN PRESENCIA DE EXUDADOS DE PLANTAS

Al igual que para los biocidas, se estudió si los exudados de plantas que provocaban la ruptura del complejo de retardo SmeT-DNA inducían *in vivo* la transcripción de la bomba SmeDEF. Se midieron los niveles de ARNm de *smeD* en presencia de los exudados y se compararon con los niveles que había en ausencia de ellos (ver materiales y métodos 3.6). Según los resultados de los ensayos de RT-PCR en tiempo real (ver Figura 25), los mejores inductores de la transcripción de la bomba serían genisteína (7 veces) y floretina (6,9 veces, SEM \pm 0,5) seguido de apigenina (5,6 veces), quercetina (3,3 veces) y naringenina (2,3 veces, SEM \pm 0,1). Debido a su interés, se estudió si el ácido acetil salicílico era capaz de inducir la expresión de SmeDEF por un mecanismo no mediado por SmeT. No se apreció diferencia significativa en presencia del fármaco (0,8 veces, SEM \pm 0,1) ni en presencia de su precursor el ácido salicílico (0,8 veces, SEM \pm 0,1).

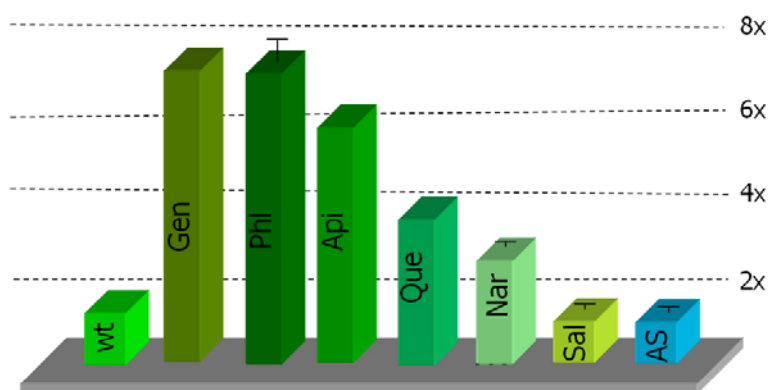


Figura 25. Niveles de ARNm de *smeD* en presencia de exudados de plantas.

Por RT-PCR se midieron los niveles de ARNm de *smeD* en la cepa silvestre *S. maltophilia* D457 en ausencia y presencia de exudados de plantas. Se observó incremento de la expresión de la bomba en presencia de genisteína (Gen), floretina (Phl), apigenina (Api), quercetina (Que) y naringenina (Nar). No se observaron cambios significativos en presencia de ácido salicílico (Sal) y de ácido acetil salicílico (AS). En apigenina, quercetina y genisteína no se marca el error estándar de la media porque los resultados se refieren a una única extracción de ARN, el resto de resultados son la media de 3 extracciones de ARNm independientes.

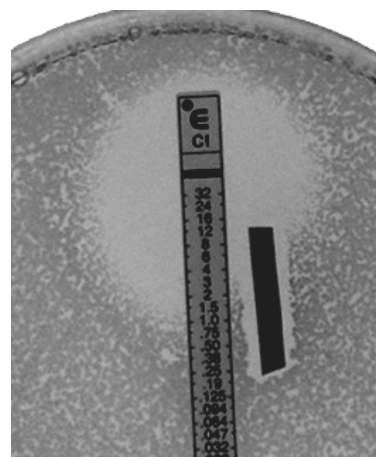
El aumento del ARNm de *smeD* en presencia de flavonoides apunta a estas moléculas como los inductores naturales de la transcripción de la bomba SmeDEF. Sin embargo los resultados respecto al ácido salicílico y al ácido acetil salicílico, los descartan como efectores de SmeT.

4.4.3.3. EFECTO DE LOS EXUDADOS DE PLANTAS EN LA SENSIBILIDAD DE *S. maltophilia* A LOS ANTIBIÓTICOS

Basándonos en los resultados de los retardos y en las RT RT-PCRs con flavonoides se hicieron ensayos de antagonismo con ciprofloxacina, similares a los llevados a cabo con los biocidas (ver materiales y métodos 3.3.3). Únicamente con floretina observamos una disminución de la sensibilidad a la quinolona en presencia de exudado (ver Figura 26). Los otros exudados analizados que no disminuyeron la sensibilidad de las bacterias que crecían próximos a ellos son: ácido salicílico, naringenina, apigenina y genisteína.

Figura 26. Efecto de la floretina sobre la sensibilidad a ciprofloxacina.

Una dilución de un cultivo en fase estacionaria de *S. maltophilia* D457 se creció ON a 37 °C en una placa de MH agar que contenían 1 tira de Etest® con ciprofloxacina. En paralelo se situó otra tira Whatman® que contenía floretina. Los valores de CMI de aquellas bacterias creciendo próximas al flavonoide aumentaban de 1 µg/ml hasta 3 µg/ml.



Aunque en base a estos resultados, la floretina sería el único de los compuestos de origen vegetal estudiados capaz de provocar un aumento de la resistencia de *S. maltophilia* a ciprofloxacina, debemos considerar que el método usado es poco sensible y por tanto cabe la posibilidad que no seamos capaces de detectar con precisión variaciones en el fenotipo de menor nivel que el observado para la floretina.

4.4.4. DOCKING DE SmeT CON SUS POSIBLES EFECTORES

Basándonos en los resultados de caracterización de los efectores de SmeT decidimos hacer estudios *in silico* para intentar determinar las afinidades teóricas de los distintos ligandos con la proteína. Estos ensayos se hicieron en colaboración con Aldo Segura y Florencio Pazos (CNB-CSIC). De acuerdo a los resultados obtenidos (ver

Figura 27), la mayoría de las interacciones entre los efectores y SmeT se deben principalmente a fuerzas hidrofóbicas y a algunos puentes hidrógeno. La energía de unión (*binding energy*) es similar entre todos ellos (entre -5.7 y -5.0 kcal/mol) siendo el ligando con mayor afinidad el hexaclorofeno (-5.73 kcal/mol) y el peor la floretina (-4.97 kcal/mol). El análisis de la orientación de los ligandos reveló que apigenina, genisteína, naringenina y quercetina exhiben conformaciones similares en el acoplamiento con SmeT. Todos los ligandos establecen interacciones hidrofóbicas con F70 y, salvo en el caso del cloruro de benzalconio, al menos uno de los anillos aromáticos del efector muestra la misma orientación.

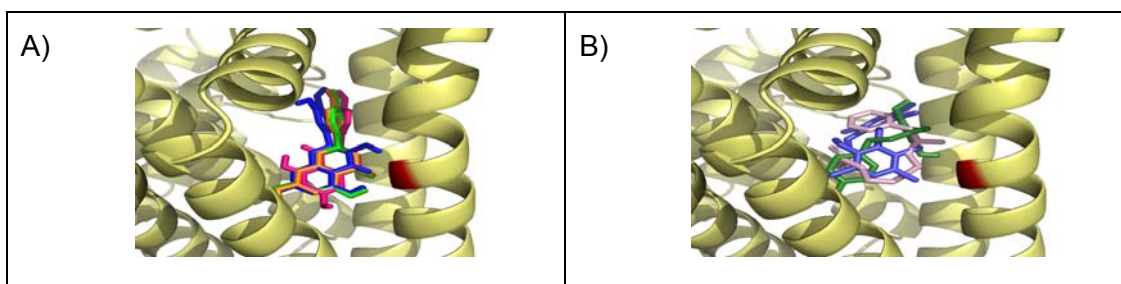


Figura 27. Docking de efectores en el bolsillo de unión de SmeT.

A) Docking de apigenina (naranja), genisteína (rosa), naringenina (verde) y quercetina (azul). B) Docking de cloruro de benzalconio (rosa claro), floretina (verde oscuro) y hexaclorofeno (azul). El residuo F70 se señala en color rojo.

Antes de resolver la estructura de SmeT unido a triclosán habíamos realizado ensayos de *docking* con este biocida. En los análisis *in silico* se había considerado que habría solo una molécula de ligando por bolsillo de unión y que los residuos de la proteína no serían flexibles. Sin embargo, en el cristal son 2 las moléculas que han entrado en uno de los bolsillos y ha habido una rotación de ciertos residuos cercanos al bolsillo de unión. Otro dato a tener en cuenta es que según los ensayos *in silico* el mejor ligando de SmeT es el hexaclorofeno. Esto coincide con los resultados de EMSA con efectores (ver resultados 4.4.2.1) que también indican que el hexaclorofeno es la molécula de la que se requiere menor concentración para romper el retardo, aunque esta capacidad por unirse de un modo eficaz a SmeT no se correlaciona con un efecto *in vivo* en los niveles de expresión de *smeDEF*.

4.5. REGULACIÓN DE OTROS SISTEMAS RND EN *S. maltophilia* EN RESPUESTA A EFECTORES

En 2008, junto a la publicación del genoma de la cepa clínica de *S. maltophilia* K279a se caracterizaron 2 nuevas bombas RND implicadas en la resistencia intrínseca de esta bacteria a los antibióticos (Crossman et al., 2008). El sistema SmeYZ era responsable de altos niveles de resistencia a aminoglicósidos, y SmeJKL contribuía a una resistencia de bajo nivel a aminoglicósidos, fluoroquinolonas y tetraciclinas (ver introducción 1.2.4).

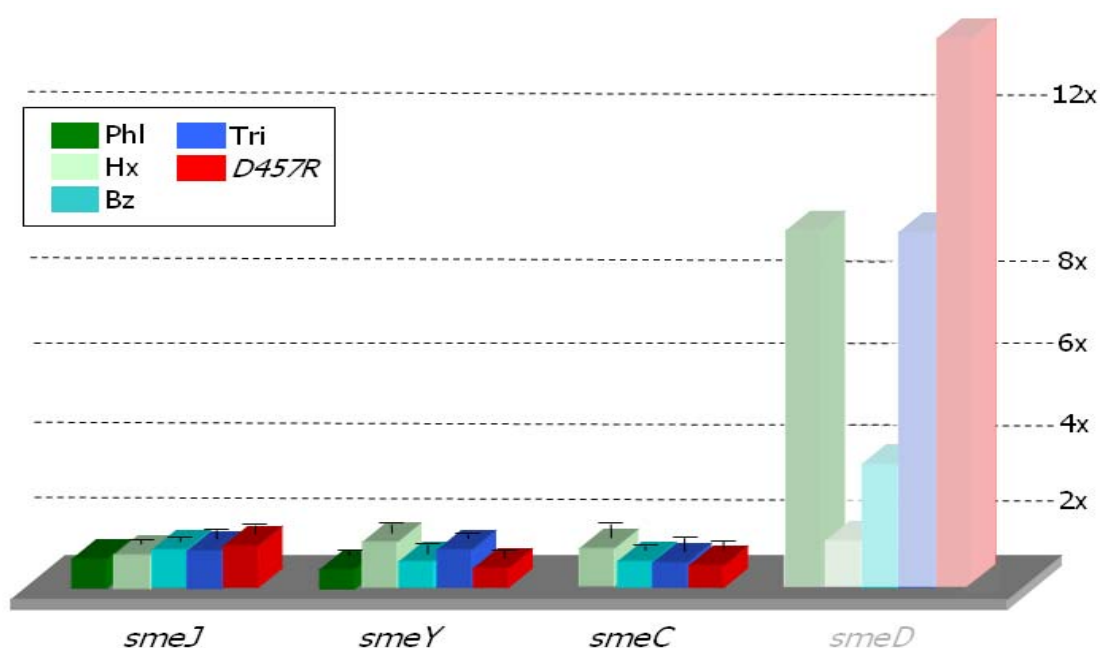


Figura 28. Niveles de transcripción de otras bombas RND implicadas en resistencia intrínseca a antibióticos en presencia de floretina y biocidas.

Por RT RT-PCR se midieron los niveles de ARNm de los genes *smeJ*, *smeC* y *smeY* en presencia de floretina y biocidas. También se midieron los niveles de ARNm de estos genes en el mutante multiresistente D457R. No se observaron variaciones significativas en ninguno de ellos. Los niveles de transcripción de *smeD* se muestran como referencia. Floretina (Phl), triclosán (Tri), cloruro de benzalconio (Bz) y hexaclorofeno (Hx).

Decidimos estudiar si, como sucedía con SmeDEF, alguna de estas 2 bombas variaba su expresión en respuesta a biocidas o a floretina. En el estudio también se incluyó SmeC, la porina del sistema SmeABC implicada en resistencia intrínseca (Li et al., 2002). Debido a la carencia de un regulador local cercano a SmeJKL también analizamos si SmeT tenía algún papel sobre la regulación de la expresión de esta bomba. Se localizaron las secuencias de *smeJ*, *smeY* y *smeC* en nuestra base de datos del proyecto de secuenciación del genoma de *S. maltophilia* D457 y se

diseñaron cebadores para estudiar la transcripción de estos genes por RT RT-PCR (ver materiales y métodos 3.6 y Tabla 3). Se analizaron los niveles de transcripción de los 3 genes tanto en la cepa D457 en presencia o ausencia de los posibles efectores como en el mutante multirresistente que sobreexpresa SmeDEF (D457R). A diferencia de lo que ocurre en el caso de *smeD*, no se observaron variaciones significativas en la transcripción de ninguno de los 3 genes en presencia de los efectores analizados.

Por otra parte, el hecho de que *smeJ*, *smeY*, o *smeC* se expresan a un nivel similar en la estirpe silvestre y en la cepa D457R que tiene un alelo defectivo de SmeT, nos indica que SmeT no regula ninguna de las otras 3 bombas RND que confieren resistencia intrínseca a antibióticos en *S. maltophilia*.

4.6. SELECCIÓN DE CEPAS MULTIRRESISTENTES POR EXPOSICIÓN A LOS BIOCIDAS

El uso masivo de biocidas en el entorno clínico, en el doméstico, e incluso en otros ámbitos como el de la construcción (cementos antibacterianos) (De Muynck et al., 2010), ha despertado gran controversia debido a los diversos estudios que relacionan la exposición a estos compuestos con el aumento de resistencia en las bacterias (Aiello and Larson, 2003; Birosova and Mikulasova, 2009; Wignall et al., 2008). En *S. maltophilia*, trabajo previo en nuestro grupo había demostrado que el triclosán selecciona mutantes con una mayor resistencia a tetraciclina, cloranfenicol y ciprofloxacina debido a que sobreexpresaban la bomba SmeDEF (Sanchez et al., 2005). Los experimentos de esta sección tienen como objetivo estudiar si la exposición a concentraciones inhibitorias de otros biocidas también seleccionan mutantes multirresistente a antibióticos.

4.6.1. EL BIOCIDA CLORURO DE BENZALCONIO SELECCIONA MUTANTES MULTIRRESISTENTES DE *S. maltophilia*

Mediante crecimiento en placas de MH agar que contenían concentraciones inhibitorias de hexaclorofeno y cloruro de benzalconio se seleccionaron mutantes de *S. maltophilia* D457 con mayor resistencia a estos biocidas (ver materiales y métodos 3.3.5). Se escogieron al azar 7 de los mutantes seleccionados con cada biocida y se compararon los niveles de CMI de diferentes antibióticos. Los resultados se muestran en las Tablas 6 y 7.

	Wt	Bz1	Bz2	Bz3	Bz4	Bz5	Bz6	Bz7
Amikacina	24	24	24	24	ND	ND	24	ND
Aztreonam	24	>256	24	24	>256	32	>256	64
Cefepime	3	8	3	4	8	3	8	6
Ceftazidime	1	2	1	1	2	1	2	1,5
Ciprofloxacina	0,75	0,75	1	1	2	0,75	8	1
Cloranfenicol	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Gatofloxacina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,75	0,25	1,5	0,5
Imipenenem	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
Levofloxacina	0,5	0,5	0,38	0,38	0,75	0,5	2	0,75
Moxifloxacina	0.125	ND	0,125	0.125	0.25	0.125	0,38	0.25
Ofloxacina	1,5	2	1,5	1,5	2-3	1,5	12	2-3
Piperacilina	24	96	32-48	32	>256	ND	>256	ND
Polimixyna	384	48	384	256	>1024	96	256	256
Rifampicina	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32

Tabla 6. CMI de diferentes antibióticos en mutantes con menor sensibilidad al benzalconio.

Los incrementos de CMI de más de 2 veces se señalan en amarillo. ND = No se determinó la CMI para este antibiótico en este mutante.

Cuatro de los 7 mutantes aparecidos en concentraciones inhibitorias de cloruro de benzalconio tenían una disminución significativa de la sensibilidad a alguno de los antibióticos analizados (ver Tabla 6). Bz1 presentaba resistencia a varios tipos de beta lactámicos, y los mutantes Bz4 y Bz6 presentaban, además de un aumento de la resistencia a beta lactámicos, una disminución de la sensibilidad a quinolonas. Ya que el cloranfenicol es un sustrato de la bomba SmeDEF, el hecho de que ninguno de los mutantes tenga alterada la sensibilidad a este antibiótico descarta en principio que, como ocurría en los mutantes aparecidos en triclosán (Sanchez et al., 2005), la bomba SmeDEF esté implicada en estos fenotipos. En los casos de Bz4 y Bz6, la distinta naturaleza de los compuestos en los que se observan aumentos de CMI sugiere que el incremento de resistencia se puede deber a variaciones en la permeabilidad de la membrana.

En el caso de los mutantes aparecidos en concentraciones inhibitorias de hexaclorofeno, ninguno de ellos presentaba variaciones importantes en los valores de CMI de los antibióticos analizados (ver tabla Tabla 7).

	Wt	Hx1	Hx2	Hx3	Hx4	Hx5	Hx7	Hx8
Amikacina	32	64	32	48	24	16	24	32
Aztreonam	16	12	16	16	10	10	12	32
Cefepime	3	3,5	3	3,5	3	2,5	2,5	2,5
Ceftazidime	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	1,5
Ciprofloxacina	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,6	0,6	1,5
Cloranfenicol	3,5	ND	3,5	3,5	3,5	2	3,5	3,5
Piperacillina	24	24	24	24	16	12	16	48

Tabla 7. CMIs de diferentes antibióticos en mutantes con menor sensibilidad al hexaclorofeno.

Incrementos de CMI de más de 2 veces se señalan en amarillo. ND = No se determinó la CMI para este antibiótico en este mutante.

Para intentar determinar la probabilidad de que estos mutantes aparecieran, se midieron las frecuencias de mutación de resistencia a los 2 biocidas, y se compararon con las de triclosán (ver materiales y métodos 3.3.5). Los mutantes con menor sensibilidad a triclosán eran los que aparecían más frecuentemente ($f_{Tri} = 7.32 \times 10^{-7} \pm 1.0 \times 10^{-7}$), seguidos de los mutantes resistentes a cloruro de benzalconio ($f_{Bz} = 3.28 \times 10^{-8} \pm 8.8 \times 10^{-9}$). La posibilidad de que aparezca un mutante de *S. maltophilia* resistente a hexaclorofeno es relativamente baja ($f_{Hx} = 5.57 \times 10^{-11} \pm 2.6 \times 10^{-11}$) y no conlleva una disminución de sensibilidad a los antibióticos.

4.6.2. FITNESS COST DE LOS MUTANTES RESISTENTES A BIOCIDAS

Con el objeto de determinar si los mutantes aparecidos en concentraciones inhibitorias de cloruro de benzalconio y hexaclorofeno presentaban coste en *fitness* comparamos sus curvas de crecimiento (ver materiales y métodos 3.3.6). Los resultados muestran que el crecimiento de los mutantes es muy similar al de la estirpe silvestre, exceptuando los casos de los mutantes Bz4 y Bz6. Estos 2 mutantes son los únicos que presentan niveles de resistencia mayores a quinolonas y beta lactámicos (ver Figura 29).

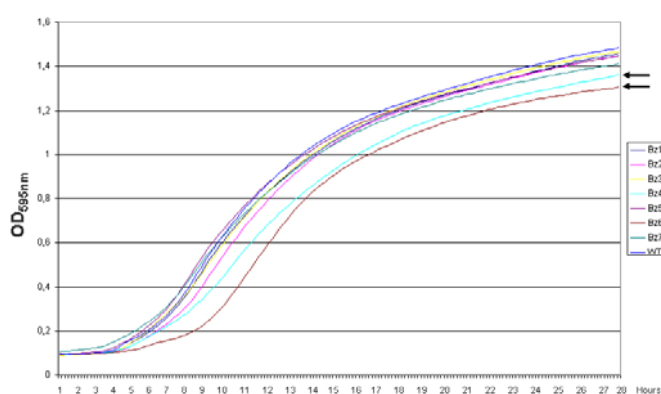


Figura 29. Curvas de crecimiento de los mutantes aparecidos en concentraciones inhibitorias de cloruro de benzalconio.

Todos los mutantes, salvo Bz4 y Bz6, presentan un crecimiento similar al del tipo silvestre *S. maltophilia* D457.

En las curvas de crecimiento de los mutantes seleccionados con hexaclorofeno no se aprecian diferencias de crecimiento respecto a la estirpe silvestre (ver Figura 30).

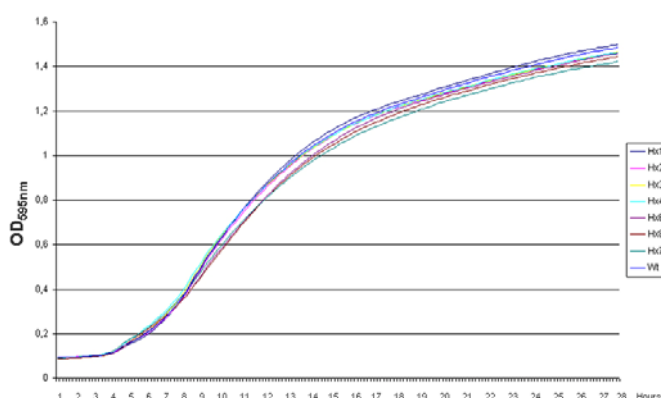


Figura 30. Curvas de crecimiento de los mutantes aparecidos en concentraciones inhibitorias de hexaclorofeno.

Todos los mutantes presentan un crecimiento similar al de la estirpe silvestre *S. maltophilia* D457.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. LA RESISTENCIA INTRÍNSECA EN *S. maltophilia*

S. maltophilia es una bacteria patógena oportunista que infecta a individuos debilitados o con una patología previa. El aumento de la frecuencia con la que se aísla a partir de muestras clínicas, así como su capacidad de colonizar diversas superficies y objetos hospitalarios (máquinas de diálisis, humidificadores, grifos o circuitos de aparatos de ventilación mecánica) ha colocado a este microorganismo en la lista de patógenos nosocomiales emergentes. La enorme resistencia a antibióticos que presenta esta bacteria (Sanchez et al., 2009) la hace difícil de erradicar del entorno hospitalario, donde acaba produciendo un amplio espectro de infecciones. Los determinantes que dan lugar a esta resistencia son inherentes a esta especie bacteriana y no han aparecido en ella por transferencia horizontal de genes o como consecuencia de mutaciones. La contribución de algunos de estos determinantes a la resistencia intrínseca de *S. maltophilia* ya ha sido descrita. Este es el caso de la beta lactamasa L1 (Walsh et al., 1994), la beta lactamasa L2 (Saino et al., 1982), de 2 aminoglicósido acetiltransferasas (Li et al., 2003; Okazaki and Avison, 2007), de la porina SmeC (Li et al., 2002) o del sistema SmeDEF (Zhang et al., 2001). La publicación en 2008 de los genomas de 2 cepas de *S. maltophilia*, una aislada a partir de una muestra de sangre de un paciente bajo quimioterapia (Crossman et al., 2008) y otra a partir de una muestra de origen vegetal (Lucas S., 2008), presentaba a *S. maltophilia* como una especie en cuyo cromosoma abundaban elementos que podían contribuir a la resistencia intrínseca a antibióticos y explicar, por tanto, el fenotipo multirresistente. Las 2 cepas, independientemente de su biotopo, comparten un arsenal de defensas contra antimicrobianos, que incluye genes de resistencia a aminoglicósidos, espectinomicina, cloranfenicol, 2 beta lactamasas y 13 transportadores MDR. Junto a la anotación del cromosoma, Crossman *et al.* determinaron la contribución de 2 nuevos sistemas RND a la resistencia intrínseca a antibióticos, la bomba SmeJKL proporcionaba resistencia de bajo nivel a gentamicina, amikacina, tetraciclina, minociclina y ciprofloxacina, y SmeYZ confería altos niveles de CMI de aminoglicósidos.

Diversos estudios han demostrado que mutaciones que dan lugar a la desregulación de los sistemas MDR convierten a la bacterias en resistentes a los antibióticos, sin embargo, el trabajo realizado en esta tesis apunta a que en condiciones normales (sin mutaciones) la función de estas bombas de expulsión de drogas no tiene que ver con la expulsión de antibióticos sino que se englobaría en

la compleja red que permite a la bacteria relacionarse con su entorno. Así, la cepa *S. maltophilia* D457, que procede de un aspirado bronquial, induce la expresión de la bomba de resistencia a múltiples drogas SmeDEF en respuesta a determinados metabolitos de plantas pero no a antibióticos. Durante los trabajos para medir la transcripción de esta bomba hemos observado que la presencia de las moléculas de origen vegetal naringenina y quercetina, induce además de la expresión de la bomba, el crecimiento de esta bacteria formando biofilms (datos no mostrados). Posiblemente, la presencia de estos metabolitos vegetales da lugar a un conjunto de respuestas bacterianas entre las que se incluye la expresión de SmeDEF, que una vez expresada expulsa colateralmente antibióticos debido a la inespecificidad de sustrato que presenta.

Otro determinante de resistencia a antibióticos con el que hemos trabajado en esta memoria es el codificado por el gen *Smqnr*. La función que ejercen las proteínas Qnr codificadas en cromosomas se desconoce, y los niveles de resistencia a quinolonas que confieren en los microorganismos que las poseen son bajos (Arsene and Leclercq, 2007; Velasco et al., 2009). Sin embargo, cuando estos genes se integran en plásmidos y quedan bajo el control de promotores fuertes pueden dar lugar a niveles de resistencia elevados.

Dado que hemos analizado determinantes de resistencia codificados en el cromosoma, el trabajo de esta tesis apunta a que los mismos determinantes que en *S. maltophilia* permiten la adaptación al medio natural en el que vive, en el entorno clínico se convierten en elementos de resistencia que permiten a este microorganismo sobrevivir a la presión selectiva de los antibióticos.

5.2. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE *S. maltophilia* D457

Actualmente estamos en las fases iniciales de un proyecto de secuenciación de la cepa clínica *S. maltophilia* D457 (ver 4.1). Algunos de los experimentos de esta tesis no se pueden explicar sin tener conocimientos de la secuencia de los genes que hemos estudiado. Por ejemplo, a partir de los datos de este proyecto de secuenciación hemos obtenido los cebadores para amplificar por RT-PCR los genes de las bombas RND *smeC*, *smeJ* y *smeY* (ver 3.2), hemos podido analizar el entorno génico de *Smqnr* en D457 (ver Figura 7), hemos determinado la presencia de un homólogo de *fabV* que podría conferir resistencia al triclosán en *S. maltophilia* (ver Figura 33), y hemos identificado la posible secuencia operadora para la autorregulación de LexA en *S. maltophilia* (ver 4.2.1). Basándonos en el trabajo de

(Rocco et al., 2009) que determina que los 2 genomas *S. maltophilia* publicados mantienen una gran sintenia pero se diferencian en determinadas regiones genómicas, hemos determinado la ausencia o presencia de dichas zonas en *S. maltophilia* D457. Según estos resultados, nuestra cepa de estudio comparte casi la mitad (8 de 19) de las regiones genómicas que aparecen únicamente en la cepa clínica K279a, pero sin embargo, carece de la mayoría (24 de 27) de las que presenta exclusivamente la cepa endofítica R551-3. Aunque estos resultados son muy preliminares y deben ser tomados con cautela, parecen indicar que aunque el genoma *core* de las distintas cepas de *S. maltophilia* está conservado, existen ciertas diferencias dependientes del nicho que ocupa la bacteria. Este tipo de estructura cromosómica (un genoma *core* grande en el que la adquisición de islotes de patogenicidad permiten a la bacteria la adaptación a un hábitat clínico) ya se ha descrito en otros patógenos oportunistas de origen medioambiental como *Burkholderia pseudomallei* (Sim et al., 2008), y contrasta con la de otras especies oportunistas de origen ambiental como *P. aeruginosa* donde un gran genoma *core* conservado permite a la bacteria sobrevivir en diferentes ambientes, sin que existan diferencias claras, a nivel genético ni a nivel funcional entre las cepas de origen clínico y las medioambientales (Alonso et al., 1999; Morales et al., 2004; Wolfgang et al., 2003). En el caso de patógenos no oportunistas, si parece sin embargo que existe una adaptación. Esta sería la situación de *E. coli*, que presenta estirpes patógenas y estirpes comensales que se diferencian por presentar un genoma accesorio diferente y un genoma *core* pequeño en comparación con las bacterias generalistas de vida libre de las que se ha hablado con anterioridad (Dobrindt et al., 2003).

5.3. EL GENOMA DE *S. maltophilia* CODIFICA UNA NUEVA PROTEÍNA DE RESISTENCIA A QUINOLONAS, SmQnr.

La publicación de los genomas de K279a y R551-3 nos proporcionó 2 bases de datos para búsquedas bioinformáticas de genes con un rol hipotético en la resistencia intrínseca de *S. maltophilia* a antibióticos. De esta manera, hemos encontrado una proteína, SmQnr, que comparte una identidad a nivel de aminoácidos de 58% con las proteínas de resistencia a quinolonas codificadas en plásmidos QnrB1 y QnrD (ver Anexo 1.1.). Además, hemos demostrado que la expresión de *Smqnr* en *E. coli* disminuye la sensibilidad del hospedador a las quinolonas (ver 4.2.2) y trabajo posterior de nuestro grupo ha implicado a esta proteína en la resistencia intrínseca a quinolonas de *S. maltophilia* (Sanchez and

Martinez, 2010). La conservación del entorno génico de *Smqnr* en las 3 cepas de *S. maltophilia* que hemos estudiado (ver Figura 7) indica que este gen no es una adquisición reciente de esta bacteria y sitúa a esta especie como posible reservorio de elementos de resistencia a quinolonas que se podrían diseminar a otras bacterias. Además de en *S. maltophilia*, hemos encontrado genes *qnr* o *qnr-like* en otras 33 especies de gammaproteobacterias, la mayoría pertenecientes a los géneros *Vibrio* y *Shewanella*. El papel de algunos de estas bacterias como reservorios de genes *qnr* ya ha sido descrito (Cattoir et al., 2007a; Poirel et al., 2005a; Poirel et al., 2005b), sin embargo, la mayoría de las proteínas Qnr-like que hemos encontrado no estaban anotadas como proteínas Qnr y no están caracterizadas.

En este trabajo también se analizaron bases de datos de metagenomas ambientales para localizar posibles genes *qnr* en especies no cultivables. Solamente encontramos genes *qnr* y *qnr-like* en una base de datos de metagenoma marino. Entre ellos apareció un gen nuevo, *Mtgqnr*, que codifica una proteína con una identidad de 94% con las proteínas plasmídicas QnrB (ver Figura 8). La presencia de genes similares a *qnr* en bacterias que suelen estar ligadas al medio acuático, la conservación de su entorno génico y su distribución exclusiva en metagenoma marino sugiere que las proteínas Qnr tienen un papel ecológico fundamental en ciertos microorganismos de hábitat acuático. Sin embargo, es fácilmente descartable la idea de que estas bacterias hayan mantenido a lo largo de su evolución una proteína que les iba a permitir ser resistentes a antibióticos sintetizados a finales del siglo XX. Por lo tanto, sigue quedando por elucidar cual es el verdadero papel que estos determinantes juegan en los microorganismos que los poseen. Recientemente se ha demostrado que la expresión de las proteínas QnrB plasmídicas está regulada por el sistema SOS (Wang et al., 2009), un sistema que se activa en respuesta a daños en el genoma bacteriano y cuya activación da lugar a la expresión de más de 20 genes, muchos de ellos implicados en reparación de ADN (Little and Mount, 1982). Se han encontrado cajas LexA cercanas al codón de inicio de estas proteínas y también adyacentes al gen *qnrB-like* codificado en el genoma de *S. marcescens* (Velasco et al., 2009). Delante del gen *Smqnr*, de *S. maltophilia*, no aparece la clásica secuencia consenso que reconoce LexA, sin embargo, hemos encontrado que este consenso tampoco aparece en el operador que autorregularía LexA en *S. maltophilia* (que es idéntico al presente en *X. axonopodis* ver 4.2.1). Por tanto, la no aparición de la típica caja LexA delante de este nuevo determinante de resistencia a quinolonas en *S. maltophilia* no implica

que no esté regulado por LexA. Para estudiar si la transcripción de *Smqnr* depende de LexA se deberían hacer ensayos de interacción con la zona promotora de *Smqnr* y la proteína LexA. La hipótesis de que ante agentes que causan daños en el ADN, determinadas bacterias expresen una proteína que asemeja en forma, carga y tamaño a un fragmento de ADN, para que esta proteína, y no el genoma, sufra el ataque de los agentes perniciosos, es una posibilidad que habría que tener en consideración.

5.4. LA PROTEÍNA SmeT REPRIME LA EXPRESIÓN DEL SISTEMA MDR SmeDEF AL UNIRSE A SU PROMOTOR

Un aspecto fundamental de esta tesis ha sido el estudio de la regulación de los sistemas MDR que contribuyen a la resistencia intrínseca a antibióticos en *S. maltophilia*. Como ya se explicó en la Introducción, la expresión de los sistemas MDR está siempre fuertemente regulada por mecanismos complejos en los que intervienen reguladores globales y reguladores específicos (ver 1.1.2). Trabajo previo en nuestro grupo había demostrado que una mutación en el regulador local del sistema SmeDEF daba lugar a un fenotipo de elevados niveles de resistencia a antibióticos en *S. maltophilia* (Alonso and Martinez, 2000). Gran parte de esta tesis ha estado dedicada a entender el mecanismo por el que el represor transcripcional SmeT controla la expresión de la bomba de expulsión múltiple de drogas SmeDEF en *S. maltophilia*.

En este trabajo hemos conseguido purificar por primera vez el represor transcripcional SmeT en su estado funcional, al clonarlo y expresarlo como una proteína de fusión a inteína (Figura 11). Anteriormente se había hecho una construcción fusionando al represor una cola de histidinas en el extremo amino terminal. Esta proteína recombinante presentaba una unión muy débil al ADN, posiblemente debido a que las seis histidinas fueron clonadas en el dominio de unión a ADN, de modo que no permitía una caracterización en detalle del sistema. La clonación de *smeT*, en el vector pTYB1, entre los sitios de restricción *SapI* y *NdeI* nos proporcionó un represor funcional y, a diferencia de lo que ocurre con otros sistemas de proteínas de fusión como *His-Tag* o *GST-Tag*, hemos podido hacer todos los ensayos con una proteína SmeT libre de residuos extra derivados del método de purificación. Además, en colaboración con María Jesús Maté y Antonio Romero (CIB-CSIC), hemos podido resolver la estructura nativa de este represor transcripcional (Figura 13).

El análisis de la estructura de SmeT mostró que, al igual que otros miembros de la familia de reguladores TetR, como QacR (Schumacher et al., 2002), EthR (Dover et al., 2004) o TtgR (Alguet et al., 2007), el represor cristaliza formando homodímeros. La posible formación de dímeros en solución ya había sido sugerida por los ensayos de *Western blot* (Figura 12). Cada monómero está formado por 9 α -hélices, siendo α -1, α -2 y α -3 las responsables de la unión al ADN y α -8 y α -9 las que tienen el papel más relevante en la dimerización. La disposición de determinados residuos de las hélices α -4, α -5, α -6, α -7 y α -8 conforma un bolsillo de unión hidrofóbico y con una ligera carga positiva al que se podrían unir diversos ligandos hidrofóbicos cargados negativamente.

Mediante ensayos de *footprinting* hemos localizado en la región intergénica *smeD-smeT* una secuencia pseudopalindrómica de 28 pb que es reconocida por el dominio *HTH* del represor. Esta secuencia operadora incluye las regiones -35 de los promotores de *smeT* y *smeD* y parte de la región -10 de *PsmeD* lo que posibilitaría la represión conjunta del sistema SmeDEF y de SmeT (Figura 14). Operadores pseudopalindrómicos análogos a este ya se han descrito para otros reguladores de la familia TetR como QacR (Schumacher et al., 2002), IcaR (Jeng et al., 2008) y TtgR (Krell et al., 2007). Estos 3 reguladores tienen una estequiometría de unión a DNA de 2 dímeros por operador lo que sugiere que SmeT seguiría el mismo modelo, ya que el modo de unión de los represores TetR al ADN depende de la naturaleza del operador y no de la estructura del dominio HTH (Orth et al., 2000; Ramos et al., 2005; Schumacher et al., 2002).

La especificidad de unión de SmeT a su ADN operador ha quedado demostrado con ensayos de retardo en gel en presencia de competidores específicos e inespecíficos (Figura 15). Además, hemos podido determinar mediante ensayos de nucleósido perdido que los nucleótidos más relevantes para la unión SmeT-ADN son TGTATGT (Figura 16) que se encuentran en la cadena que codifica la bomba SmeDEF, entre las posiciones -18 y -24 a partir del sitio de inicio de transcripción de *smeD*, formando parte de la secuencia operadora de SmeT. La importancia de estos 7 nucleótidos (y sus 7 complementarios), localizados en uno de los extremos distales del operador, quedó patente con los EMSA que se realizaron con sondas que contenían diferentes partes del operador (Figura 17).

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente explicado hemos propuesto un modelo de unión SmeT-DNA operador según el cual el regulador se uniría a su secuencia operadora como un par de homodímeros (Figura 31). El hecho de que el operador al que se une SmeT cubra los promotores solapantes de *smeD* y *smeT*,

permitiría que existiera constantemente una autorregulación negativa del sistema. Este tipo de autorregulación prevendría un coste metabólico innecesario ya que es 5 veces más rápida en alcanzar la transcripción de los genes regulados que cualquier otro tipo de regulación (Rosenfeld et al., 2002).

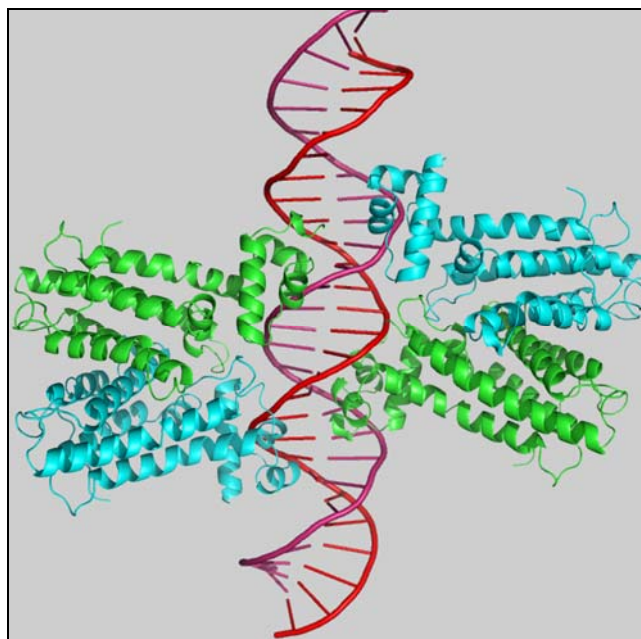


Figura 31. Modelo de unión SmeT-ADN operador.

Al igual que las otras proteínas de la familia TetR que presentan como operador una secuencia pseudopalindrómica de 28 pb, SmeT se uniría al ADN como un par de homodímeros. Este dibujo está basado en la estructura de QacR unido a DNA (Schumacher et al., 2002) y no es un modelado sino la superposición de 2 estructuras de SmeT unido al triclosán sobre un fragmento de ADN de 28 pb.

5.5. SmeT REGULA LA EXPRESIÓN DE SmeDEF EN RESPUESTA A EFECTORES

Lejos de lo que parece indicar su nombre, los sistemas de bombeo de múltiples drogas, además de drogas, son capaces de expulsar un amplio rango de moléculas que incluye disolventes orgánicos (Ramos et al., 1998), factores de virulencia (Cosson et al., 2002), ácidos grasos (Lee and Shafer, 1999), detergentes (Zhang et al., 2001), biocidas (Sánchez et al., 2005), sales biliares (Thanassi et al., 1997), autoinductores de *quorum sensing* (Evans et al., 1998) y exudados de plantas (Alguet et al., 2007). Esta inespecificidad de sustrato unido a su presencia ubicua en todos los seres vivos y al hecho de que se expresan a un nivel basal detectable incluso en ausencia de antibióticos (Saier et al., 2002; Tao et al., 1999) apuntan a que el papel primario de estos transportadores no es la resistencia a antibióticos

(Piddock, 2006). Una de las funciones que se atribuye a los sistemas MDR es la detoxificación de metabolitos. Estas moléculas se acumulan en mayor cantidad cuando la bacteria está en fase estacionaria, sin embargo, ciertas bombas como SmeDEF tienen su máxima expresión en la fase exponencial lo que sugiere que el rol principal de SmeDEF no es la de expulsión de metabolitos perjudiciales para la bacteria (Alonso and Martinez, 2001). Igualmente, se sabe que la expresión de esta bomba es mayor a 25°C que a 37 °C (Sanchez, 2002) lo que indica que esta bomba no ha evolucionado, en principio, para funcionar cuando *S. maltophilia* infecta a un mamífero. Además, los estudios realizados sobre reguladores de sistemas MDR indican que el control de la transcripción de estas bombas, salvo en algunas excepciones como TetR (Hillen and Berens, 1994), no se suelen ejercer en respuesta a antibióticos sino a determinadas moléculas presentes en el hábitat natural (no infectivo) donde viven las bacterias. Así, la expulsión de antibióticos ocurriría de forma fortuita y el uso indiscriminado de antibióticos y biocidas podrían estar contribuyendo a la selección de bacterias que poseen, de modo natural en su genoma, bombas MDR eficaces. Teniendo presente esta idea de que los sistemas de resistencia a múltiples drogas no han evolucionado necesariamente para resistir a la presencia de antibióticos en los sistemas naturales (Piddock, 2006), hemos realizado experimentos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* con el objeto de determinar cuales son los ligandos efectores de SmeT. Como candidatos seleccionamos moléculas que pudieran aparecer tanto en el entorno clínico (antibióticos y biocidas) como en el entorno ambiental (exudados de plantas) de *S. maltophilia*.

Para los EMSA con efectores se permitió primero la unión SmeT-DNA y luego se añadieron los posibles ligandos. Los ensayos de retardo se plantearon de este modo buscando una situación análoga a la que se debe dar en el interior de la bacteria, donde el represor se encontraría unido a la zona intergénica *smeT-smeD* y se soltaría del ADN cuando un efector entrara en el bolsillo de unión. En el regulador TtgR se ha demostrado que la afinidad de la proteína por determinados exudados de plantas es mayor cuando la proteína se encuentra unida al ADN, lo que sugiere que existen ciertas diferencias en el bolsillo de unión cuando la proteína se encuentra unida al operador (Teran et al., 2006). De este modo, pudimos determinar que, *in vitro*, 3 biocidas (hexaclorofeno, triclosán y cloruro de benzalconio) y 8 metabolitos de origen vegetal (los flavonoides naringenina, floreтина, cumestrol, genisteína, apigenina y quercetina, y la hormona vegetal ácido salicílico) actúan como efectores de SmeT y son capaces de provocar la desunión del complejo represor-ADN (ver Figura 19 y Figura 20). Con estos ensayos también

hemos descartado, en principio, que la expresión SmeDEF se induzca, como consecuencia de la unión de SmeT a los antibióticos que son sustratos de la bomba (cloranfenicol, eritromicina, novobiocina, ácido nalidíxico y ciprofloxacina) o a otros que no los son (amikacina, imipenem y ampicilina) (ver 4.4.1). Aunque en los EMSA en presencia de tetraciclina, que es sustrato de la bomba, desaparece la banda de retardo, tenemos ciertas dudas en incluir este antibiótico como efector de SmeT ya que la capacidad de este antimicrobiano de unirse a ADN es conocida (Levinson, 1978) y si bien los retardos se hicieron en presencia del ADN inespecífico poli(dI-C), no podemos descartar que la tetraciclina se haya unido a la sonda modificándola y con ello haber desprendido al regulador sin haberse unido a su bolsillo de unión. Confirmar el papel de la tetraciclina como efector real de SmeT requeriría por tanto de otro tipo de experimentos como mediciones de diferencias en la estabilidad de la proteína en presencia y ausencia del antibiótico.

Los resultados de los EMSA con efectores nos proporcionaron una lista de posibles ligandos de SmeT, sin embargo no demostraban que estas moléculas fueran capaces de modificar la unión del regulador al ADN en el interior de la bacteria. Con el propósito de estudiar si estos hipotéticos inductores iniciaban *in vivo* la expresión de la bomba SmeDEF cuantificamos, por RT RT-PCR, los niveles de ARNm de *smeD* en presencia de estas moléculas. Los resultados de estos ensayos indican que los mayores niveles de desrepresión de la transcripción de la bomba se alcanzaban en presencia de triclosán (8,7 veces), seguido de genisteína (7 veces), floretina (6,9 veces), apigenina (5,6 veces), quercetina (3,3 veces), cloruro de benzalconio (3 veces) y naringenina (2,3 veces) (ver Figura 20 y Figura 25). Aunque quedaba demostrado que estas moléculas eran efectores de SmeT, ninguna de ellas era capaz de lograr los niveles de inducción de la transcripción de la bomba que se alcanzan en la cepa *S. maltophilia* D457R (13,7 veces) que presenta un alelo mutante de SmeT incapaz de reprimir la expresión de la bomba.

Basándonos en los resultados que indicaban que en presencia de los efectores de SmeT hay una mayor transcripción de SmeDEF, supusimos que en presencia de estos ligandos, la capacidad de la bacteria de expulsar antibióticos que son sustratos de la bomba sería mayor. Para confirmar la correlación entre efectores de SmeT y el aumento en la CMI, realizamos ensayos de antagonismo en placas de MH con ciprofloxacina. Elegimos esta quinolona ya que se había comprobado en los EMSA que era incapaz de actuar como efector de SmeT (ver Figura 18) y además su CMI en el mutante D457R, que sobreexpresa la bomba, es 8 veces mayor que en la cepa silvestre (Sanchez et al., 2005). Los resultados de los

ensayos de antagonismo demostraron que la sensibilidad de *S. maltophilia* D457 a la ciprofloxacina disminuía en presencia de triclosán, cloruro de benzalconio y floretina (ver Figura 21 y Figura 26). A pesar de que según estos ensayos, la mayoría de exudados de plantas que provocan la desrepresión de la transcripción de la bomba no darían lugar a una disminución en la sensibilidad a los antibióticos sustratos, debemos considerar que el método que hemos usado es poco sensible, y que la expresión de la bomba puede no ser suficiente para contrarrestar el daño que está causando el antibiótico.

Dentro de este apartado de efectores de SmeT hemos dedicado especial atención al triclosán. Ya se ha comentado a lo largo de la memoria que este biocida está presente en la composición de una multitud de productos, desde artículos de uso común para higiene personal (jabones de manos, pastas de dientes, colutorios, etc), hasta ropa para prácticas quirúrgicas e incluso en materiales de construcción de encimeras de cocina antibacterianas (De Muynck et al., 2010; Jones et al., 2000). También se ha comentado que se ha correlacionado la sobreexposición al triclosán con mutaciones que afectan al control de los sistemas MDR bacterianos, con lo que aumenta la resistencia a determinados antibióticos (Aiello and Larson, 2003; Bailey et al., 2009; Huet et al., 2008). Si bien el triclosán se ha descrito como sustrato habitual de sistemas MDR (Chuanchuen et al., 2002; Gotoh et al., 1995; Poole, 2001), no hemos podido encontrar ningún trabajo que incluya a este biocida como efector de reguladores transcripcionales de bombas MDR. La cristalización de SmeT con 2 moléculas de triclosán en el bolsillo de unión de una de las subunidades del dímero (ver Figura 23), corrobora todos los resultados anteriores que demuestran que el triclosán es un ligando de SmeT. Por lo tanto, este trabajo es la primera evidencia de que el triclosán es un efector de un regulador transcripcional de bombas MDR.

Basándonos en los resultados arriba mencionados sugerimos un modelo que explicaría por qué la sensibilidad a quinolonas de *S. maltophilia* disminuye de en presencia de este biocida, aunque los niveles alcanzados son inferiores a los observados en el mutante D457R (ver Figura 32). El aumento de la concentración intracelular de triclosán acabaría provocando la unión de este ligando a SmeT que permitiría la expresión de la bomba SmeDEF. La expulsión de triclosán por SmeDEF daría lugar a que se redujeran los niveles del biocida dentro de la bacteria y, colateralmente, disminuiría la sensibilidad de la bacteria a las quinolonas que son sustrato de la bomba debido a su expulsión. Sin embargo, dado que el triclosán

tiene efecto antimicrobiano, no se alcanzarían los niveles de resistencia observados en el mutante D457R.

Aunque con este trabajo queda demostrado el papel que el represor transcripcional SmeT juega en la expulsión del triclosán, este mecanismo no justifica los elevados niveles de resistencia intrínseca al biocida que presenta *S. maltophilia*.

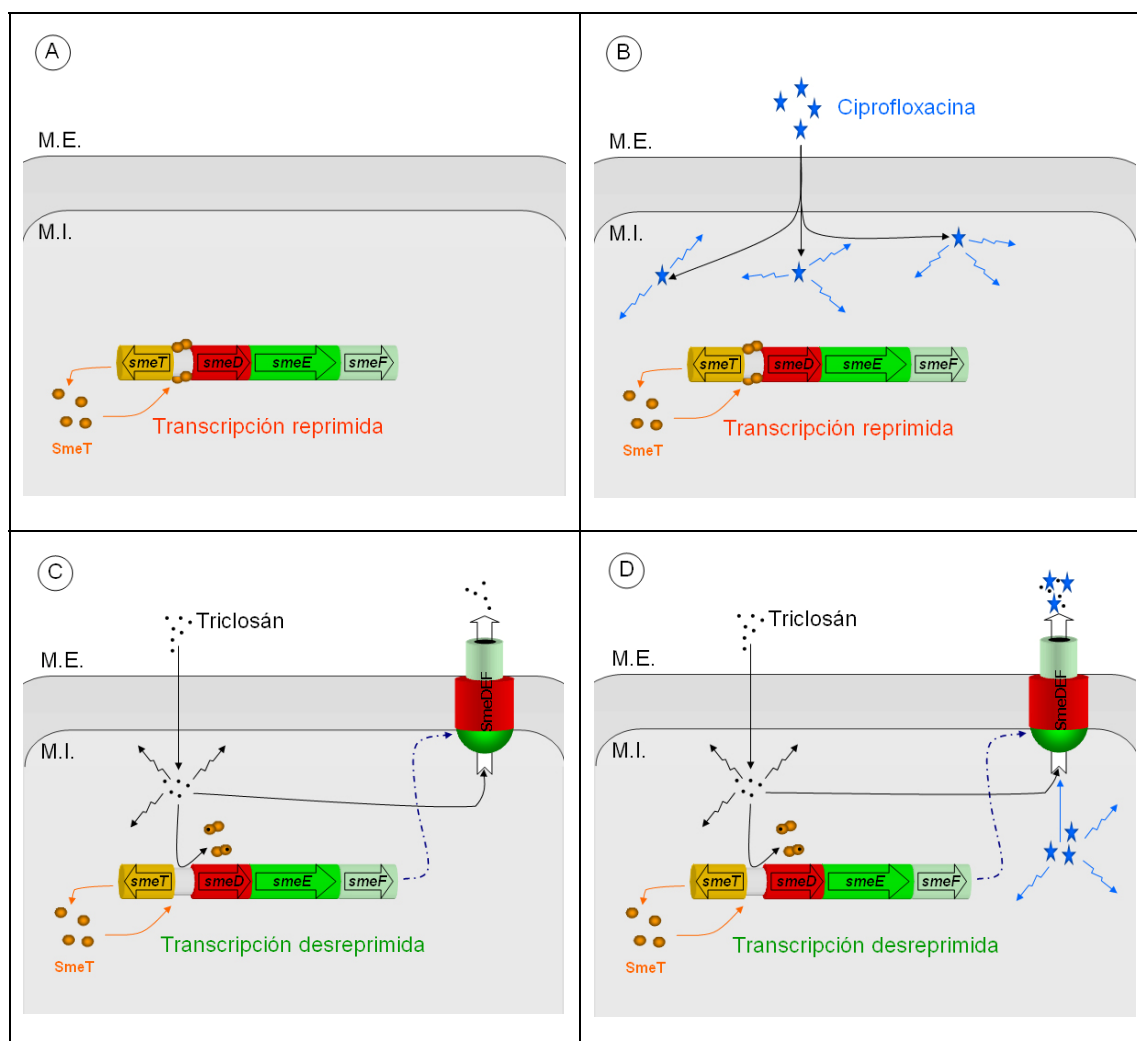


Figura 32. Mecanismo de expulsión de ciprofloxacina en presencia de triclosán.

A) En estado no inducido SmeT (círculos naranjas) reprime la transcripción de *smeDEF*. B) La ciprofloxacina (estrellas azules) no es un efector de SmeT y la entrada de la quinolona provoca daños en la bacteria. C) La unión del triclosán (círculos negros) a SmeT provoca la desrepresión de la transcripción del operón *smeDEF* y la expulsión del biocida, con lo que se mitigan los daños que este causa a la bacteria. D) Mientras la bomba está expresada debido a la presencia del triclosán, se expulsan también los antibióticos, como la ciprofloxacina, que son sustratos de SmeDEF. M.E.= Membrana externa, M.I.= Membrana interna.

En bacterias como *E. coli* la sensibilidad al triclosán viene dada por la unión del biocida a una proteína ENR (*enoyl-acyl carrier protein reductase*) denominada FabI

(*Fatty acid biosíntesis I*) implicada en la biosíntesis de ácidos grasos (Stewart et al., 1999). Como cabe esperar, modificaciones en esta proteína confieren resistencia al biocida. Recientemente, la resistencia intrínseca de *V. cholerae* (Massengo-Tiasse and Cronan, 2008) y *P. aeruginosa* PAO1 (Zhu et al., 2010) al triclosán ha sido atribuida a la presencia de una proteína ENR denominada FabV. Teniendo en cuenta estas últimas publicaciones, hemos realizado una búsqueda de genes similares a *fabV* en el genoma de *S. maltophilia* D457 y hemos localizado un homólogo que comparte un 75% de identidad con la proteína FabV de *P. aeruginosa* y 59 % con FabV de *V. cholerae*. Esta proteína aparece también codificada en los genomas de *S. maltophilia* K279a y R551-3. El hallazgo de esta nueva FabV invita a sugerir que en la resistencia intrínseca al triclosán en *S. maltophilia* contribuyen, al menos, SmeT-SmeDEF y FabV.

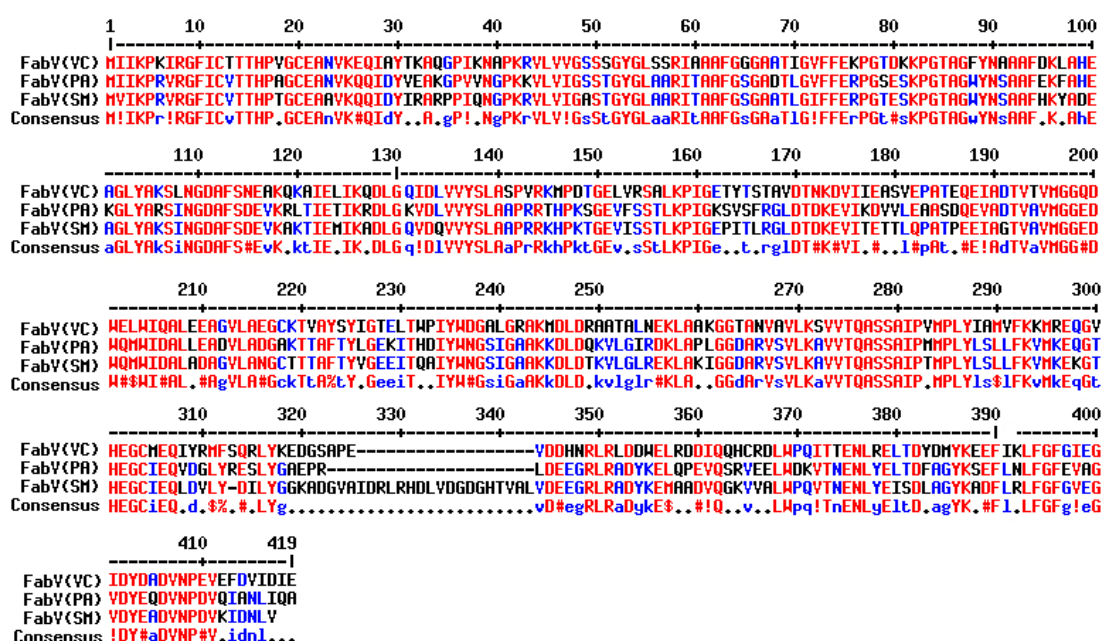


Figura 33. Alineamiento de las proteínas FabV de *V. chlorerae*, *P. aeruginosa* y *S. maltophilia* D457.

La proteína homóloga a FabV que hemos hallado en el genoma de *S. maltophilia* (SM) tiene una identidad de 59% con la de *V. chlorerae* (VC) y de 75% con la de *P. aeruginosa* (PA). Entre las proteínas de *Vibrio* y *Pseudomonas* la identidad es de 57%.

Para completar la caracterización de los efectores de SmeT, decidimos realizar un estudio *in silico* de la posibilidad que las distintas moléculas candidatas tenían de encajar en el bolsillo de unión de la proteína (ver 4.4.4). Nos llamó la atención que los resultados de *docking* predijeran como mejor ligando al hexaclorofeno, lo que coincidía con los ensayos de EMSA, pero contradecía los ensayos *in vivo*.

Según los datos obtenidos por RT-PCR este biocida no provoca cambios significativos en los niveles de expresión de SmeDEF. Una explicación plausible de estos resultados es que aunque SmeT tenga gran afinidad por el hexaclorofeno la interacción proteína-ligando nunca se llega a dar, seguramente debido a que el biocida mata a la bacteria antes de darla tiempo a iniciar la expresión de ningún mecanismo para su expulsión.

Los ensayos de *docking* pertenecen a un trabajo más amplio en el que mediante *virtual screening* y *molecular dynamics* estamos intentando encontrar los efectores naturales de SmeT y nuevas moléculas que impidan la expresión de SmeDEF. El hallazgo de nuevas moléculas que se unan de modo irreversible al bolsillo de unión de SmeT y no den lugar a los cambios estructurales que acaban provocando la sobreexpresión de la bomba (ver Introducción 1.2.3), proporcionaría nuevos fármacos que evitarían la resistencia múltiple a antibióticos mediada por la bomba de expulsión de drogas más importante en *S. maltophilia*, el sistema SmeDEF.

5.6. NINGUNA DE LAS OTRAS BOMBAS RND IMPLICADAS EN RESISTENCIA INTRÍNSECA A ANTIBIÓTICOS EN *S. maltophilia* RESPONDE A LOS BIOCIDAS O A LA FLORETINA.

El estudio de un transportador MDR a nivel individual presenta cierta dificultad ya que generalmente existe un solapamiento en el perfil de los sustratos de los distintos sistemas MDR de un mismo organismo. A la delección de uno de estos transportadores, la bacteria puede responder con la sobreexpresión de otras bombas que compensan su eliminación (Morita et al., 2001; Poole, 2004). En *S. maltophilia*, antibióticos como tetraciclina o ciprofloxacina son sustratos tanto de SmeDEF como de SmeJKL (Crossman et al., 2008; Sanchez et al., 2005). El trabajo sobre los efectores de SmeT, había demostrado que el triclosán, el cloruro de benzalconio y la floretina daban lugar a una disminución en los niveles de sensibilidad de *S. maltophilia* a ciprofloxacina. Este hecho quedaba explicado por una mayor expresión de la bomba SmeDEF y la consiguiente mayor expulsión de la fluoroquinolona (ver 5.5). Con el propósito de estudiar si la expresión de SmeJKL, y de las otras 2 bombas RND implicadas en resistencia a antibióticos (SmeYZ y SmeABC), también variaba en presencia de estos 3 efectores se midieron, por RT-PCR, los niveles de ARNm de los genes *smeC*, *smeJ* y *smeY*, en ausencia/presencia de los 3 efectores. No se observaron cambios significativos en la transcripción de ninguno de los 3 genes (ver Figura 28), lo que indica que tan

solo SmeDEF participa en la respuesta de *S. maltophilia* al aumento de la concentración intracelular de los biocidas triclosán y cloruro de benzalconio y del flavonoide de origen vegetal fletetina. Dado que se comparaba la expresión de estos sistemas MDR en la estirpe silvestre y en el mutante D457R que tiene un alelo no funcional de SmeT, estos experimentos también descartaban que SmeT fuera un regulador del sistema SmeJKL del que no se conoce regulador.

5.7. EL BIOCIDA CLORURO DE BENZALCONIO SELECCIONA MUTANTES RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

Otro de los aspectos que hemos abordado en esta memoria es la posible selección de bacterias resistentes a antibióticos como consecuencia de la presencia de biocidas. Diversos trabajos demuestran que, *in vitro*, determinados biocidas pueden seleccionar bacterias resistentes a los antibióticos (Levy, 2002; Sanchez et al., 2005), sin embargo, ciertos estudios con bacterias patógenas aisladas de muestras clínicas y ambientales, que han estado sometidas al uso de biocidas, indican que estos microorganismos no presentan una mayor resistencia a antibióticos (Cole et al., 2003). En *S. maltophilia* ya se había demostrado que el triclosán es capaz de seleccionar mutantes resistentes a tetraciclina, cloranfenicol y ciprofloxacina debido a que sobreexpresaban la bomba SmeDEF (Sanchez et al., 2005). Teniendo presente nuestro trabajo sobre el cloruro de benzalconio como efector de SmeT, decidimos estudiar si ante la sobreexposición a este biocida también acaban apareciendo mutantes multirresistentes. Los resultados de estos experimentos confirmaron que el cloruro de benzalconio selecciona mutantes multirresistentes, sin embargo, en esta resistencia no parece estar implicada la bomba SmeDEF (ver 4.6.1). Entre los mutantes aparecidos en concentraciones inhibitorias del biocida ninguno presentaba un aumento significativo de la resistencia a los antibióticos que son sustratos de SmeDEF. La distinta naturaleza de los antibióticos a los que los mutantes son resistentes hace suponer que la resistencia a cloruro de benzalconio, al menos en los 2 mutantes que presentan un fenotipo con sensibilidad reducida a beta lactámicos y quinolonas se deba a cambios en la permeabilidad de la membrana. A favor de esta hipótesis, los datos iniciales de un trabajo que actualmente estamos realizando sobre las diferencias en el uso de nutrientes entre los mutantes Bz4 y Bz6, y la cepa parental D457, parecen indicar que los mutantes utilizan dipéptidos básicos de una manera mas eficiente que la estirpe parental, lo que podría indicar cambios, bien en la permeabilidad, bien en la expresión de transportadores. Estos resultados de paneles metabólicos

de BIOLOG se están haciendo en colaboración con Francesca Decorosi y Carlo Viti (Università di Firenze, Italia) y se podrían explicar por una mejor entrada de estos nutrientes en *S. maltophilia*.

También con experimentos de selección de mutantes resistentes a biocidas descartamos que el hexaclorofeno seleccione mutantes de *S. maltophilia* con mayor resistencia a antibióticos. La frecuencia con la que aparecen mutantes resistentes a este biocida es muy baja.

Como resumen de los trabajos sobre la relación entre exposición a biocidas y resistencia a antibióticos en *S. maltophilia*, podemos afirmar que tanto el triclosán como el cloruro de benzalconio seleccionan mutantes con resistencia cruzada a antibióticos. El triclosán es el agente que selecciona mutantes con mayor frecuencia ($f_{Tri} = 7.32 \times 10^{-7} \pm 1.0 \times 10^{-7}$) y su resistencia a antibióticos se debe a una mayor expresión de la bomba SmeDEF (Sanchez et al., 2005). Los mutantes resistentes a cloruro de benzalconio aparecen con una frecuencia menor ($f_{Bz} = 3.28 \times 10^{-8} \pm 8.8 \times 10^{-9}$) y su resistencia a antibióticos, que podría venir determinada por cambios en la permeabilidad de la membrana, conlleva un coste fisiológico para la bacteria. La posibilidad de que aparezcan mutantes resistentes a hexaclorofeno es muy baja ($f_{Hx} = 5.57 \times 10^{-11} \pm 2.6 \times 10^{-11}$) y cuando estos aparecen no son resistentes a los antibióticos analizados. Este trabajo demuestra que tanto el triclosán como el cloruro de benzalconio pueden seleccionar mutantes resistentes a los antibióticos. El hecho de que dichos mutantes presenten un cierto coste biológico podría justificar que aún no se hayan encontrado mutantes con mayor resistencia a antibióticos en ambientes expuestos a biocidas, sin embargo, la posibilidad de que esto suceda, al menos en *S. maltophilia*, es real.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1- El análisis de los genomas completos de *S. maltophilia* indica que su genoma *core* es grande, como corresponde a una bacteria de vida libre, pero los distintos aislados podrían tener elementos génicos específicos del ambiente en el que viven.

2- *S. maltophilia* codifica en su cromosoma una proteína de la familia Qnr, a la que hemos denominado SmQnr, que confiere resistencia a quinolonas cuando se expresa en un huésped heterólogo.

3- La presencia de genes similares a *qnrB* codificados en genomas de bacterias de hábitat acuático y su distribución exclusiva en metagenomas ambientales marinos, sugieren que al igual que sucede con las QnrA, las proteínas QnrB codificadas en plásmidos podrían tener su reservorio natural en bacterias acuáticas.

4- La proteína SmeT reprime la transcripción del operón de la bomba SmeDEF, al unirse de forma específica a una secuencia pseudopalindrómica de 28 pb que se localiza en la zona donde se solapan los promotores de los genes *smeT* y *smeD*. Dentro de este operador se ha determinado que la secuencia TGTATGT, en la cadena que codifica la bomba, es crítica para que se establezca la unión ADN-SmeT.

5- La proteína SmeT cristaliza como un dímero. Cada monómero se pliega formando 9 α -hélices. Las 3 hélices del extremo N-terminal constituyen el dominio de unión a ADN y las hélices restantes forman el bolsillo de unión al efector y el dominio de dimerización.

6- El sistema MDR SmeDEF de *S. maltophilia* se expresa en respuesta a determinados biocidas (triclosán y cloruro de benzalconio) y exudados de plantas (genisteína, floretina, apigenina, quercetina y naringenina). Todas estas moléculas actúan como efectores del regulador transcripcional SmeT provocando la desrepresión de la transcripción de la bomba.

7- La exposición a los biocidas triclosán y cloruro de benzalconio selecciona mutantes de *S. maltophilia* más resistentes a los antibióticos, mientras que el hexaclorofeno no selecciona resistencia. La posibilidad de seleccionar resistencia a antibióticos por biocidas viene atenuada por el coste metabólico que lleva asociado.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Aiello, A. E., and Larson, E. (2003). Antibacterial cleaning and hygiene products as an emerging risk factor for antibiotic resistance in the community. *Lancet Infect Dis* 3, 501-506.

Akama, H., Matsuura, T., Kashiwagi, S., Yoneyama, H., Narita, S., Tsukihara, T., Nakagawa, A., and Nakae, T. (2004). Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 279, 25939-25942.

Alekshun, M. N., and Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 128, 1037-1050.

Alguel, Y., Meng, C., Teran, W., Krell, T., Ramos, J. L., Gallegos, M. T., and Zhang, X. (2007). Crystal structures of multidrug binding protein TtgR in complex with antibiotics and plant antimicrobials. *J Mol Biol* 369, 829-840.

Alonso, A., and Martinez, J. L. (1997). Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 1140-1142.

Alonso, A., and Martinez, J. L. (2000). Cloning and characterization of SmeDEF, a novel multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 3079-3086.

Alonso, A., and Martinez, J. L. (2001). Expression of multidrug efflux pump SmeDEF by clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 1879-1881.

Alonso, A., Rojo, F., and Martinez, J. L. (1999). Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environ Microbiol* 1, 421-430.

Andersson, D. I., and Levin, B. R. (1999). The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2, 489-493.

Arsene, S., and Leclercq, R. (2007). Role of a *qnr*-like gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 3254-3258.

Atlas, R. M. (1993). *Handbook of Microbiological Media*.

Ba, B. B., Feghali, H., Arpin, C., Saux, M. C., and Quentin, C. (2004). Activities of ciprofloxacin and moxifloxacin against *Stenotrophomonas maltophilia* and emergence of resistant mutants in an in vitro pharmacokinetic-pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 946-953.

Bailey, A. M., Constantinidou, C., Ivens, A., Garvey, M. I., Webber, M. A., Coldham, N., Hobman, J. L., Wain, J., Woodward, M. J., and Piddock, L. J. (2009). Exposure of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to triclosan induces a species-specific response, including drug detoxification. *J Antimicrob Chemother* 64, 973-985.

Baranova, N., and Nikaido, H. (2002). The baeSR two-component regulatory system activates transcription of the yegMNOB (mdtABCD) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. *J Bacteriol* 184, 4168-4176.

Barber, M. (1947). *Staphylococcal* Infection due to Penicillin-resistant Strains. *Br Med J* 2, 863-865.

- Barbosa, T. M., and Levy, S. B. (2000). Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J Bacteriol* 182, 3467-3474.
- Birosova, L., and Mikulasova, M. (2009). Development of triclosan and antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Med Microbiol* 58, 436-441.
- Blair, J. M., and Piddock, L. J. (2009). Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Curr Opin Microbiol* 12, 512-519.
- Brooun, A., Tomashek, J. J., and Lewis, K. (1999). Purification and ligand binding of EmrR, a regulator of a multidrug transporter. *J Bacteriol* 181, 5131-5133.
- Buckley, A. M., Webber, M. A., Cooles, S., Randall, L. P., La Ragione, R. M., Woodward, M. J., and Piddock, L. J. (2006). The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiol* 8, 847-856.
- Cagliero, C., Maurel, M. C., Cloeckaert, A., and Payot, S. (2007). Regulation of the expression of the CmeABC efflux pump in *Campylobacter jejuni*: identification of a point mutation abolishing the binding of the CmeR repressor in an in vitro-selected multidrug-resistant mutant. *FEMS Microbiol Lett* 267, 89-94.
- Cattoir, V., Poirel, L., Mazel, D., Soussy, C. J., and Nordmann, P. (2007a). *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 2650-2651.
- Cattoir, V., Poirel, L., and Nordmann, P. (2007b). Plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrB4 identified in France in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate coexpressing a QnrS1 determinant. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 2652-2653.
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. M., and Barton, G. J. (2004). The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* 20, 426-427.
- Cohen, S. P., Levy, S. B., Foulds, J., and Rosner, J. L. (1993). Salicylate induction of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: activation of the mar operon and a mar-independent pathway. *J Bacteriol* 175, 7856-7862.
- Cole, E. C., Addison, R. M., Rubino, J. R., Leese, K. E., Dulaney, P. D., Newell, M. S., Wilkins, J., Gaber, D. J., Wineinger, T., and Criger, D. A. (2003). Investigation of antibiotic and antibacterial agent cross-resistance in target bacteria from homes of antibacterial product users and nonusers. *J Appl Microbiol* 95, 664-676.
- Crossman, L. C., Gould, V. C., Dow, J. M., Vernikos, G. S., Okazaki, A., Sebahia, M., Saunders, D., Arrowsmith, C., Carver, T., Peters, N., *et al.* (2008). The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol* 9, R74.
- Chong, S., Mersha, F. B., Comb, D. G., Scott, M. E., Landry, D., Vence, L. M., Perler, F. B., Benner, J., Kucera, R. B., Hirvonen, C. A., *et al.* (1997). Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene* 192, 271-281.
- Chong, S., Montello, G. E., Zhang, A., Cantor, E. J., Liao, W., Xu, M. Q., and Benner, J. (1998). Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step. *Nucleic Acids Res* 26, 5109-5115.
- Chuanchuen, R., Gaynor, J. B., Karkhoff-Schweizer, R., and Schweizer, H. P. (2005). Molecular characterization of MexL, the transcriptional repressor of the mexJK multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 1844-1851.

- Chuanchuen, R., Narasaki, C. T., and Schweizer, H. P. (2002). The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J Bacteriol* 184, 5036-5044.
- Daigle, D. M., Cao, L., Fraud, S., Wilke, M. S., Pacey, A., Klinoski, R., Strynadka, N. C., Dean, C. R., and Poole, K. (2007). Protein modulator of multidrug efflux gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189, 5441-5451.
- Davies, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264, 375-382.
- Dawson, R. J., and Locher, K. P. (2006). Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* 443, 180-185.
- De Muynck, W., De Belie, N., and Verstraete, W. (2010). Antimicrobial mortar surfaces for the improvement of hygienic conditions. *J Appl Microbiol* 108, 62-72.
- Deitz, W. H., Bailey, J. H., and Froelich, E. J. (1963). In Vitro Antibacterial Properties of Nalidixic Acid, a New Drug Active against Gram-Negative Organisms. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* 161, 583-587.
- DeMarco, C. E., Cushing, L. A., Frempong-Manso, E., Seo, S. M., Jaravaza, T. A., and Kaatz, G. W. (2007). Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 3235-3239.
- Dobrindt, U., Agerer, F., Michaelis, K., Janka, A., Buchrieser, C., Samuelson, M., Svanborg, C., Gottschalk, G., Karch, H., and Hacker, J. (2003). Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J Bacteriol* 185, 1831-1840.
- Dover, L. G., Corsino, P. E., Daniels, I. R., Cocklin, S. L., Tatituri, V., Besra, G. S., and Futterer, K. (2004). Crystal structure of the TetR/CamR family repressor *Mycobacterium tuberculosis* EthR implicated in ethionamide resistance. *J Mol Biol* 340, 1095-1105.
- Duque, E., Segura, A., Mosqueda, G., and Ramos, J. L. (2001). Global and cognate regulators control the expression of the organic solvent efflux pumps TtgABC and TtgDEF of *Pseudomonas putida*. *Mol Microbiol* 39, 1100-1106.
- Eguchi, Y., Oshima, T., Mori, H., Aono, R., Yamamoto, K., Ishihama, A., and Utsumi, R. (2003). Transcriptional regulation of drug efflux genes by EvgAS, a two-component system in *Escherichia coli*. *Microbiology* 149, 2819-2828.
- Engohang-Ndong, J., Baillat, D., Aumercier, M., Bellefontaine, F., Besra, G. S., Locht, C., and Baulard, A. R. (2004). EthR, a repressor of the TetR/CamR family implicated in ethionamide resistance in mycobacteria, octamerizes cooperatively on its operator. *Mol Microbiol* 51, 175-188.
- Erill, I., Escribano, M., Campoy, S., and Barbe, J. (2003). In silico analysis reveals substantial variability in the gene contents of the gamma proteobacteria LexA-regulon. *Bioinformatics* 19, 2225-2236.
- Espinosa-Urgel, M., Kolter, R., and Ramos, J. L. (2002). Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. *Microbiology* 148, 341-343.
- Fajardo, A., Martinez-Martin, N., Mercadillo, M., Galan, J. C., Ghysels, B., Matthijs, S., Cornelis, P., Wiehlmann, L., Tummeler, B., Baquero, F., and Martinez, J. L. (2008). The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One* 3, e1619.

- Ferrara, A. M. (2006). Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 27, 183-195.
- Gomez-Gomez, J. M., Blazquez, J., Espinosa De Los Monteros, L. E., Baquero, M. R., Baquero, F., and Martinez, J. L. (1997). In vitro plasmid-encoded resistance to quinolones. *FEMS Microbiol Lett* 154, 271-276.
- Gotoh, N., Tsujimoto, H., Poole, K., Yamagishi, J., and Nishino, T. (1995). The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by oprK of the mexA-mexB-oprK multidrug resistance operon. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 2567-2569.
- Grkovic, S., Brown, M. H., and Skurray, R. A. (2002). Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 671-701, table of contents.
- Guex, N., and Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- Gustafsson, I., Cars, O., and Andersson, D. I. (2003). Fitness of antibiotic resistant *Staphylococcus epidermidis* assessed by competition on the skin of human volunteers. *J Antimicrob Chemother* 52, 258-263.
- Hansen, L. H., Johannesen, E., Burmolle, M., Sorensen, A. H., and Sorensen, S. J. (2004). Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3332-3337.
- Hegde, S. S., Vetting, M. W., Roderick, S. L., Mitchenall, L. A., Maxwell, A., Takiff, H. E., and Blanchard, J. S. (2005). A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science* 308, 1480-1483.
- Hernandez, A., Mate, M. J., Sanchez-Diaz, P. C., Romero, A., Rojo, F., and Martinez, J. L. (2009). Structural and functional analysis of SmeT, the repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. *J Biol Chem* 284, 14428-14438.
- Hillen, W., and Berens, C. (1994). Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* 48, 345-369.
- Hooper, D. C. (1999). Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat* 2, 38-55.
- Huet, A. A., Raygada, J. L., Mendiratta, K., Seo, S. M., and Kaatz, G. W. (2008). Multidrug efflux pump overexpression in *Staphylococcus aureus* after single and multiple in vitro exposures to biocides and dyes. *Microbiology* 154, 3144-3153.
- Hurdle, J. G., O'Neill, A. J., and Chopra, I. (2004). The isoleucyl-tRNA synthetase mutation V588F conferring mupirocin resistance in glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* is not associated with a significant fitness burden. *J Antimicrob Chemother* 53, 102-104.
- Jacoby, G., Cattoir, V., Hooper, D., Martinez-Martinez, L., Nordmann, P., Pascual, A., Poirel, L., and Wang, M. (2008). *qnr* Gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 2297-2299.
- Jacoby, G. A., Walsh, K. E., Mills, D. M., Walker, V. J., Oh, H., Robicsek, A., and Hooper, D. C. (2006). *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1178-1182.
- Jeng, W. Y., Ko, T. P., Liu, C. I., Guo, R. T., Liu, C. L., Shr, H. L., and Wang, A. H. (2008). Crystal structure of IcaR, a repressor of the TetR family implicated in biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Nucleic Acids Res* 36, 1567-1577.

- Jones, M. E., Peters, E., Weersink, A. M., Fluit, A., and Verhoef, J. (1997). Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. *Lancet* 349, 1742-1743.
- Jones, R. D., Jampani, H. B., Newman, J. L., and Lee, A. S. (2000). Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *Am J Infect Control* 28, 184-196.
- Juliano, R. L., and Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455, 152-162.
- Kehrenberg, C., Friederichs, S., de Jong, A., and Schwarz, S. (2008). Novel variant of the *qnrB* gene, *qnrB12*, in *Citrobacter werkmanii*. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 1206-1207.
- Kitamoto, O., N. Kasai, K. Fukaya, and A. Kawashima (1956). Drug-sensitivity of the *Shigella* strains isolated in 1955. [In Japanese] *J Japan Assoc Infectious Diseases* 30, 403-404.
- Kohler, T., Epp, S. F., Curty, L. K., and Pechere, J. C. (1999). Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181, 6300-6305.
- Kohler, T., van Delden, C., Curty, L. K., Hamzehpour, M. M., and Pechere, J. C. (2001). Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183, 5213-5222.
- Konstantinidis, K. T., and Tiedje, J. M. (2004). Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3160-3165.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., and Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405, 914-919.
- Krell, T., Teran, W., Mayorga, O. L., Rivas, G., Jimenez, M., Daniels, C., Molina-Henares, A. J., Martinez-Bueno, M., Gallegos, M. T., and Ramos, J. L. (2007). Optimization of the palindromic order of the TtgR operator enhances binding cooperativity. *J Mol Biol* 369, 1188-1199.
- Kunonga, N. I., Sobieski, R. J., and Crupper, S. S. (2000). Prevalence of the multiple antibiotic resistance operon (*marRAB*) in the genus *Salmonella*. *FEMS Microbiol Lett* 187, 155-160.
- Lee, E. H., Rouquette-Loughlin, C., Folster, J. P., and Shafer, W. M. (2003). FarR regulates the farAB-encoded efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* via an MtrR regulatory mechanism. *J Bacteriol* 185, 7145-7152.
- Levinson, P. M. a. W. (1978). Nucleic-acid binding by tetracycline metal ion complexes. *Bioinorganic Chemistry* 9, 421-429.
- Levy, S. B. (2002). Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*, 65S-71S.
- Lewis, K. (2001). In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3, 247-254.
- Li, X. Z., Ma, D., Livermore, D. M., and Nikaido, H. (1994). Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 38, 1742-1752.

- Li, X. Z., Zhang, L., McKay, G. A., and Poole, K. (2003). Role of the acetyltransferase AAC(6')-Iz modifying enzyme in aminoglycoside resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother* 51, 803-811.
- Li, X. Z., Zhang, L., and Poole, K. (2002). SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 333-343.
- Little, J. W., and Mount, D. W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* 29, 11-22.
- Looney, W. J., Narita, M., and Muhlemann, K. (2009). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect Dis* 9, 312-323.
- Lucas S., C. A., Lapidus A., Glavina del Rio T., Dalin E., Tice H., Pitluck S., Chain P., Malfatti S., Shin M., Vergez L., Lang D., Schmutz J., Larimer F., Land M., Hauser L., Kyrpides N., Mikhailova N., Taghavi S., Monchy S., Newman L., Vangronsveld J., van der Lelie D., Richardson P (2008). Complete sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3. EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- Luong, T. T., Dunman, P. M., Murphy, E., Projan, S. J., and Lee, C. Y. (2006). Transcription Profiling of the mgrA Regulon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 188, 1899-1910.
- Llanes, C., Neuwirth, C., El Garch, F., Hocquet, D., and Plesiat, P. (2006). Genetic analysis of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect* 12, 270-278.
- Ma, D., Alberti, M., Lynch, C., Nikaido, H., and Hearst, J. E. (1996). The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of acrAB genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol Microbiol* 19, 101-112.
- Martin, R. G., Bartlett, E. S., Rosner, J. L., and Wall, M. E. (2008). Activation of the *Escherichia coli* marA/soxS/rob regulon in response to transcriptional activator concentration. *J Mol Biol* 380, 278-284.
- Martinez-Martinez, L., Pascual, A., and Jacoby, G. A. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 351, 797-799.
- Martinez, J. L. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* 321, 365-367.
- Martinez, J. L., Sanchez, M. B., Martinez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., and Alvarez-Ortega, C. (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 33, 430-449.
- Massengo-Tiasse, R. P., and Cronan, J. E. (2008). *Vibrio cholerae* FabV defines a new class of enoyl-acyl carrier protein reductase. *J Biol Chem* 283, 1308-1316.
- Maxam, A. M., and Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 560-564.
- McMurry, L., Petrucci, R. E., Jr., and Levy, S. B. (1980). Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 3974-3977.
- Mett, H., Rosta, S., Schacher, B., and Frei, R. (1988). Outer membrane permeability and beta-lactamase content in *Pseudomonas maltophilia* clinical isolates and laboratory mutants. *Rev Infect Dis* 10, 765-769.
- Morales, G., Ugidos, A., and Rojo, F. (2006). Inactivation of the *Pseudomonas putida* cytochrome o ubiquinol oxidase leads to a significant change in the transcriptome and to

increased expression of the CIO and cbb3-1 terminal oxidases. *Environ Microbiol* 8, 1764-1774.

Morales, G., Wiehlmann, L., Gudowius, P., van Delden, C., Tummeler, B., Martinez, J. L., and Rojo, F. (2004). Structure of *Pseudomonas aeruginosa* populations analyzed by single nucleotide polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis genotyping. *J Bacteriol* 186, 4228-4237.

Morita, Y., Komori, Y., Mima, T., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2001). Construction of a series of mutants lacking all of the four major mex operons for multidrug efflux pumps or possessing each one of the operons from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: MexCD-OprJ is an inducible pump. *FEMS Microbiol Lett* 202, 139-143.

Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T., and Yamaguchi, A. (2006). Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* 443, 173-179.

Murray, D. S., Schumacher, M. A., and Brennan, R. G. (2004). Crystal structures of QacR-diamidine complexes reveal additional multidrug-binding modes and a novel mechanism of drug charge neutralization. *J Biol Chem* 279, 14365-14371.

Nies, D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 27, 313-339.

Nishino, K., and Yamaguchi, A. (2002). EvgA of the two-component signal transduction system modulates production of the yhiUV multidrug transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184, 2319-2323.

Okazaki, A., and Avison, M. B. (2007). Aph(3')-IIc, an aminoglycoside resistance determinant from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 359-360.

Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W., and Hinrichs, W. (2000). Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat Struct Biol* 7, 215-219.

Piddock, L. J. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* 4, 629-636.

Poirel, L., Liard, A., Rodriguez-Martinez, J. M., and Nordmann, P. (2005a). *Vibrionaceae* as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants. *J Antimicrob Chemother* 56, 1118-1121.

Poirel, L., Rodriguez-Martinez, J. M., Mammeri, H., Liard, A., and Nordmann, P. (2005b). Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 3523-3525.

Poole, K. (2001). Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4, 500-508.

Poole, K. (2004). Efflux pumps, In *Pseudomonas*, J.-L. Ramos, ed. (New York: Kluwer Academic / Plenum Publisher), pp. 636-641.

Ramos, J. L., Martinez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M. T., Brennan, R., and Tobes, R. (2005). The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 326-356.

Randall, L. P., and Woodward, M. J. (2002). The multiple antibiotic resistance (mar) locus and its significance. *Res Vet Sci* 72, 87-93.

- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C. H., Bush, K., and Hooper, D. C. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 12, 83-88.
- Rocco, F., De Gregorio, E., Colonna, B., and Di Nocera, P. P. (2009). *Stenotrophomonas maltophilia* genomes: a start-up comparison. *Int J Med Microbiol* 299, 535-546.
- Rojo, F., and Alonso, J. C. (1995). The beta recombinase of plasmid pSM19035 binds to two adjacent sites, making different contacts at each of them. *Nucleic Acids Res* 23, 3181-3188.
- Romanenko, L. A., Uchino, M., Tanaka, N., Frolova, G. M., Slinkina, N. N., and Mikhailov, V. V. (2008). Occurrence and antagonistic potential of *Stenotrophomonas* strains isolated from deep-sea invertebrates. *Arch Microbiol* 189, 337-344.
- Rosenfeld, N., Elowitz, M. B., and Alon, U. (2002). Negative autoregulation speeds the response times of transcription networks. *J Mol Biol* 323, 785-793.
- Rusch, D. B., Halpern, A. L., Sutton, G., Heidelberg, K. B., Williamson, S., Yooseph, S., Wu, D., Eisen, J. A., Hoffman, J. M., Remington, K., *et al.* (2007). The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. *PLoS Biol* 5, e77.
- Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., Berg, G., van der Lelie, D., and Dow, J. M. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol* 7, 514-525.
- Saino, Y., Kobayashi, F., Inoue, M., and Mitsuhashi, S. (1982). Purification and properties of inducible penicillin beta-lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 22, 564-570.
- Sambrook, J. a. R. D. W. (2001). *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Third edn (New York: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Sanchez, M. B., Hernandez, A., and Martinez, J. L. (2009). *Stenotrophomonas maltophilia* drug resistance. *Future Microbiol* 4, 655-660.
- Sanchez, M. B., Hernandez, A., Rodriguez-Martinez, J. M., Martinez-Martinez, L., and Martinez, J. L. (2008). Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants. *BMC Microbiol* 8, 148.
- Sanchez, M. B., and Martinez, J. L. (2010). SmQnr contributes to intrinsic resistance to quinolones in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 580-581.
- Sanchez, P. (2002). Coste biológico y regulación de la resistencia multiple a los antibióticos. Tesis doctoral.
- Sanchez, P., Alonso, A., and Martinez, J. L. (2002). Cloning and characterization of SmeT, a repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3386-3393.
- Sanchez, P., Moreno, E., and Martinez, J. L. (2005). The biocide triclosan selects *Stenotrophomonas maltophilia* mutants that overproduce the SmeDEF multidrug efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 781-782.
- Schumacher, M. A., and Brennan, R. G. (2002). Structural mechanisms of multidrug recognition and regulation by bacterial multidrug transcription factors. *Mol Microbiol* 45, 885-893.

- Schumacher, M. A., Miller, M. C., Grkovic, S., Brown, M. H., Skurray, R. A., and Brennan, R. G. (2002). Structural basis for cooperative DNA binding by two dimers of the multidrug-binding protein QacR. *Embo J* 21, 1210-1218.
- Shen, L. L., Kohlbrenner, W. E., Weigl, D., and Baranowski, J. (1989). Mechanism of quinolone inhibition of DNA gyrase. Appearance of unique norfloxacin binding sites in enzyme-DNA complexes. *J Biol Chem* 264, 2973-2978.
- Shimizu, K., Kikuchi, K., Sasaki, T., Takahashi, N., Ohtsuka, M., Ono, Y., and Hiramatsu, K. (2008). *Smqnr*, a new chromosome-carried quinolone resistance gene in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 3823-3825.
- Sim, S. H., Yu, Y., Lin, C. H., Karuturi, R. K., Wuthiekanun, V., Tuanyok, A., Chua, H. H., Ong, C., Paramalingam, S. S., Tan, G., *et al.* (2008). The core and accessory genomes of *Burkholderia pseudomallei*: implications for human melioidosis. *PLoS Pathog* 4, e1000178.
- Singh, A. K., Haldar, R., Mandal, D., and Kundu, M. (2006). Analysis of the topology of *Vibrio cholerae* NorM and identification of amino acid residues involved in norfloxacin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3717-3723.
- Smith, E. E., Buckley, D. G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., Miller, S. I., Ramsey, B. W., Speert, D. P., Moskowitz, S. M., *et al.* (2006). Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8487-8492.
- Stewart, M. J., Parikh, S., Xiao, G., Tonge, P. J., and Kisker, C. (1999). Structural basis and mechanism of enoyl reductase inhibition by triclosan. *J Mol Biol* 290, 859-865.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D. C., and Robicsek, A. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 22, 664-689.
- Teran, W., Krell, T., Ramos, J. L., and Gallegos, M. T. (2006). Effector-repressor interactions, binding of a single effector molecule to the operator-bound TtgR homodimer mediates derepression. *J Biol Chem* 281, 7102-7109.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. (2002). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 2*, Unit 2 3.
- Tran, J. H., Jacoby, G. A., and Hooper, D. C. (2005). Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 118-125.
- Ubarretxena-Belandia, I., Baldwin, J. M., Schuldiner, S., and Tate, C. G. (2003). Three-dimensional structure of the bacterial multidrug transporter EmrE shows it is an asymmetric homodimer. *Embo J* 22, 6175-6181.
- Udani, R. A., and Levy, S. B. (2006). MarA-like regulator of multidrug resistance in *Yersinia pestis*. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2971-2975.
- Valdezate, S., Vindel, A., Saez-Nieto, J. A., Baquero, F., and Canton, R. (2005). Preservation of topoisomerase genetic sequences during in vivo and in vitro development of high-level resistance to ciprofloxacin in isogenic *Stenotrophomonas maltophilia* strains. *J Antimicrob Chemother* 56, 220-223.
- Velasco, C., Rodriguez-Martinez, J. M., Briaes, A., Diaz de Alba, P., Calvo, J., and Pascual, A. (2009). *Smaqnr*, a new chromosome-encoded quinolone resistance determinant in *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother*.

- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., *et al.* (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304, 66-74.
- Vetting, M. W., Hegde, S. S., Fajardo, J. E., Fiser, A., Roderick, S. L., Takiff, H. E., and Blanchard, J. S. (2006). Pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry* 45, 1-10.
- Vier, H., Schaberg, T., and Gillissen, A. (2007). [Emergence extensive drug resistance tuberculosis (XDR)]. *Pneumologie* 61, 606-609.
- Vila J., F. A., Roca I., Hernandez A, Martinez JL (2010). Efflux pumps as an important mechanism of quinolone resistance. *Advances in Enzymology*.
- Walsh, T. R., Hall, L., Assinder, S. J., Nichols, W. W., Cartwright, S. J., MacGowan, A. P., and Bennett, P. M. (1994). Sequence analysis of the L1 metallo-beta-lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim Biophys Acta* 1218, 199-201.
- Walsh, T. R., MacGowan, A. P., and Bennett, P. M. (1997). Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 1460-1464.
- Wang, M., Jacoby, G. A., Mills, D. M., and Hooper, D. C. (2009). SOS regulation of *qnrB* expression. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 821-823.
- WHO (2010). Antimicrobial resistance (WHO).
- Wignall, G. R., Goneau, L. W., Chew, B. H., Denstedt, J. D., and Cadieux, P. A. (2008). The effects of triclosan on uropathogen susceptibility to clinically relevant antibiotics. *J Endourol* 22, 2349-2356.
- Wolfgang, M. C., Kulasekara, B. R., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q., Miyada, C. G., and Lory, S. (2003). Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8484-8489.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Konda, T., and Arakawa, Y. (2007). New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 3354-3360.
- Yang, M. K., Hsu, C. H., and Sung, V. L. (2008). Analyses of binding sequences of the two LexA proteins of *Xanthomonas axonopodis* pathovar citri. *Mol Genet Genomics* 280, 49-58.
- Yin, Y., He, X., Szewczyk, P., Nguyen, T., and Chang, G. (2006). Structure of the multidrug transporter EmrD from *Escherichia coli*. *Science* 312, 741-744.
- Zhang, L., Li, X. Z., and Poole, K. (2001). SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 3497-3503.
- Zhu, L., Lin, J., Ma, J., Cronan, J. E., and Wang, H. (2010). Triclosan resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is due to FabV, a triclosan-resistant enoyl-acyl carrier protein reductase. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 689-698.

ANEXO

ANEXO 1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

1. TABLA DE PORCENTAJE DE IDENTIDAD ENTRE PROTEÍNAS Qnr CROMOSÓMICAS Y Qnr PLASMÍDICAS

Plasmídico	Cromosómico	%	Plasmídico	Cromosómico	%
QnrA1	SaQnrA1	100	QnrB1	CyoQnr	93
QnrA1	SaQnrA3	98	QnrB1	MtgQnr	93
QnrA1	VfuQnr	72	QnrB1	SodQnr	87
QnrA1	VshQnr	67	QnrB1	SprQnr	83
QnrA1	AlsQnr	64	QnrB1	SmaQnr	80
QnrA1	VfQnr	64	QnrB1	YbeQnr	71
QnrA1	VorQnr	64	QnrB1	PalQnr	64
QnrA1	ShaQnr	63	QnrB1	SmQnr	58
QnrA1	PsQnr	62	QnrB1	SwoQnr	52
QnrA1	SfrQnr	61	QnrB1	VfuQnr	51
QnrA1	SwoQnr	61	QnrB1	PprQnr	46
QnrA1	MsQnr	59	QnrB1	PanQnr	45
QnrA1	SpaQnr	59	QnrB1	PdaQnr	45
QnrA1	VhQnr	59	QnrB1	SbeQnr	45
QnrA1	VspQnr	59	QnrB1	SseQnr	44
QnrA1	PprQnr	58	QnrB1	VshQnr	43
QnrA1	SbeQnr	58	QnrB1	AhQnr	42
QnrA1	VcoQnr	58	QnrB1	MsQnr	42
QnrA1	VvQnr	58	QnrB1	SfrQnr	42
QnrA1	SseQnr	57	QnrB1	ShaQnr	42
QnrA1	PdaQnr	56	QnrB1	SpaQnr	42
QnrA1	ValQnr	56	QnrB1	ValQnr	42
QnrA1	VpQnr	56	QnrB1	VcoQnr	42
QnrA1	SpiQnr	55	QnrB1	VhQnr	42
QnrA1	SliQnr	54	QnrB1	VorQnr	42
QnrA1	PanQnr	53	QnrB1	VpQnr	42
QnrA1	AhQnr	49	QnrB1	SaQnrA3	41
QnrA1	AsQnr	45	QnrB1	PsQnr	41
QnrA1	SodQnr	42	QnrB1	SpiQnr	41
QnrA1	SmaQnr	42	QnrB1	VfQnr	41
QnrA1	YbeQnr	42	QnrB1	AsQnr	40
QnrA1	CyoQnr	41	QnrB1	SaQnrA1	40
QnrA1	SprQnr	41	QnrB1	VspQnr	40
QnrA1	MtgQnr	41	QnrB1	VvQnr	39
QnrA1	PalQnr	39	QnrB1	AlsQnr	38
QnrA1	SmQnr	38	QnrB1	SliQnr	38

Plasmídico	Cromosómico	%	Plasmídico	Cromosómico	%
QnrC	VfuQnr	80	QnrD	YbeQnr	67
QnrC	VorQnr	71	QnrD	SodQnr	65
QnrC	AlsQnr	66	QnrD	MtgQnr	65
QnrC	VfQnr	66	QnrD	CyoQnr	64
QnrC	ShaQnr	65	QnrD	PalQnr	64
QnrC	VshQnr	65	QnrD	SprQnr	64
QnrC	SaQnrA1	64	QnrD	SmaQnr	62
QnrC	SaQnrA3	64	QnrD	SmQnr	58
QnrC	VspQnr	64	QnrD	VfuQnr	52
QnrC	SfrQnr	63	QnrD	SaQnrA3	47
QnrC	PsQnr	60	QnrD	SaQnrA1	46
QnrC	VhQnr	59	QnrD	SbeQnr	46
QnrC	SwoQnr	58	QnrD	SpaQnr	46
QnrC	VcoQnr	58	QnrD	SwoQnr	46
QnrC	VvQnr	58	QnrD	VfQnr	46
QnrC	PprQnr	56	QnrD	VshQnr	46
QnrC	ValQnr	56	QnrD	PprQnr	45
QnrC	VpQnr	56	QnrD	SseQnr	45
QnrC	PdaQnr	55	QnrD	ValQnr	45
QnrC	MsQnr	54	QnrD	VorQnr	45
QnrC	SbeQnr	53	QnrD	VpQnr	45
QnrC	SpiQnr	53	QnrD	AlsQnr	44
QnrC	SpaQnr	52	QnrD	MsQnr	44
QnrC	SseQnr	51	QnrD	PdaQnr	44
QnrC	PanQnr	50	QnrD	SfrQnr	44
QnrC	SliQnr	45	QnrD	VvQnr	44
QnrC	AhQnr	44	QnrD	AhQnr	43
QnrC	SodQnr	43	QnrD	PanQnr	43
QnrC	SmaQnr	43	QnrD	PsQnr	43
QnrC	YbeQnr	43	QnrD	ShaQnr	43
QnrC	AsQnr	42	QnrD	SpiQnr	43
QnrC	CyoQnr	42	QnrD	VhQnr	43
QnrC	SprQnr	42	QnrD	AsQnr	42
QnrC	MtgQnr	42	QnrD	VcoQnr	42
QnrC	PalQnr	39	QnrD	SliQnr	41
QnrC	SmQnr	36	QnrD	VspQnr	40

Plasmídico	Cromosómico	%
QnrS1	VspQnr	83
QnrS1	VfuQnr	68
QnrS1	VshQnr	65
QnrS1	AlsQnr	64
QnrS1	VfQnr	62
QnrS2	SaQnrA3	60
QnrS3	SaQnrA1	59
QnrS1	VorQnr	59
QnrS1	SfrQnr	56
QnrS1	SwoQnr	56
QnrS1	VcoQnr	56
QnrS1	ShaQnr	55
QnrS1	PsQnr	54
QnrS1	ValQnr	54
QnrS1	VpQnr	54
QnrS1	PprQnr	53
QnrS1	SbeQnr	53
QnrS1	SseQnr	53
QnrS1	VvQnr	53
QnrS1	MsQnr	51
QnrS1	VhQnr	51
QnrS1	PanQnr	50
QnrS1	PdaQnr	50
QnrS1	SliQnr	50
QnrS1	SpaQnr	50
QnrS1	SpiQnr	49
QnrS1	AhQnr	41
QnrS1	YbeQnr	41
QnrS1	CyoQnr	40
QnrS1	SodQnr	39
QnrS1	SmaQnr	39
QnrS1	MtgQnr	39
QnrS1	AsQnr	38
QnrS1	SprQnr	37
QnrS1	PalQnr	36
QnrS1	SmQnr	36

Tabla 8. Porcentaje de identidad entre las proteínas Qnr cromosómicas y las Qnr plasmídicas.

En la tabla se incluye la proteína MtgQnr presente en el metagenoma marino

2. ABREVIATURAS DE LOS ENTORNOS DE GENES *qnr-LIKE* CROMOSÓMICOS

AAT	Acetyltransferase in HXT11-HXT8	GntR	GntR family transcriptional regulator
ABCa	ABC transport ATP-binding subunit	GntR	Transcriptional regulator GntR
ABCp	ABC transport membrane permease	GroEL	Chaperonin GroEL
AC	Adenylate cyclase	HAD	HAD-superfamily subfamily IB hydrolase
AcoAS	Acyl-CoA synthetase	HMP	hydrogenase maturation protease
AcrB	AcrB/D/F family	HP	Hypothetical protein
AcT	Acetyltransferase	HSP	Hypothetical secreted protein
ADH	Alcohol dehydrogenase	HydA	hydrogenase (NiFe) small subunit HydA
AldDH	Aldehyde dehydrogenase	HypF	Ni/Fe hydrogenase maturation protein HypF
Aldol	2-dehydro-deoxyphosphogluconate aldolase	IclR	IclR-family protein, transcriptional regulator
AmT	Amidinotransferase	IH	Isochorismatase hydrolase
AS	Arylsulfatase	IMP	Putative integral membrane protein
AsnCTR	AsnC family transcriptional regulator	Integr	Integron integrase
ASR	Putative arylsulfatase regulator	LacI	LacI transcriptional regulator
AT	Ribosomal-protein-alanine acetyltransferase	LGL	Lactoylglutathione lyase
ATPase	ATPase, possibly involved in inorganic ion	LMTG	Soluble lytic murein transglycosylase
ATPSA	ATP synthase subunit A protein	LP	Lipoprotein
ATPSB	ATP synthase subunit C	LpP	Lipoprotein
CBP	Chitin-binding protein	LysE	LysE family transporter
CobCh	Putative cobalt chelatase	LysR	LysR family transcriptional regulator
CobT	Putative cobalamin biosynthesis cobT protein	LL	Lactoylglutathione lyase
Cpn10	chaperonin Cpn10	M23B	Peptidase M23B family
CSDNA	Cold-shock DNA-binding domain protein	mACP	Methyl-accepting chemotaxis protein
CyaY	CyaY, involved in iron scavenging / transfer to heme	MarR	Transcriptional regulator, MarR family protein
Cytc	Cytochrome c family protein	MATE	MATE efflux family protein
Cytc553	Cytochrome c553	MFP	Membrane-fusion protein
CytcOI	Cytochrome-c oxidase, subunit II	MFS	Permeases of the major facilitator superfamily
CytcOII	Cytochrome-c oxidase, subunit II	MFS1	MFS Multidrug resistance efflux protein
CheYR	CheY-like receiver	Mper	Putative melibiose permease II
CheYRR	CheY-like response regulator	MRhoT	Modulator of Rho-dependent transcription
dAdC	diaminopimelate decarboxylase	Mscs	MscS Mechanosensitive ion channel
dAdE	diaminopimelate epimerase	MT12	Methyltransferase type 12
DeoR	DeoR family transcriptional regulator	NADdA	NAD-dependent deacetylase
dH	predicted dehydrogenase	NADHO	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase
DNApε	DNA polymerase III subunit epsilon	NaH+Ap	Na ⁺ /H ⁺ antiporter
DNApψ	DNA polymerase III subunit psi	NiFeH	Ni/Fe-hydrogenase, b-type cytochrome subunit
dO	Putative ring-cleaving dioxygenase	NiH	nickel-dependent hydrogenase
DUF6	DUF6, transmembrane protein	NPN	Nucleoside permease NupC, transcriptional regulator
dUTP	dUTPase	OmpW	Outer membrane protein OmpW
FADdO	FAD dependent oxidoreductase	O-MT	O-methyltransferase
FcBP	Ferrichrome-binding protein	OPRT	orotate phosphoribosyltransferase
G3PDH	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase,	OxRe	Oxidoreductase protein
Gbtter	Glycine betaine transporter	PAH	PepSY-associated TM helix
GFA	Glutathione-dependent formaldehyde-activating	PAT	Phosphate acetyltransferase
GK	Gluconate kinase	PCA	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase
GK	Thermoresistant gluconokinase	PD	Polysaccharide deacetylase
Gn	Gluconate transporter	Perm	Permease
GnT	Low affinity GNT 1 system	PGDH	Phosphogluconate dehydratase
GnTA	Gluconate transport-associated protein	PGDH	Phosphoglycerate dehydrogenase

PGM	Phosphoglyceromutase	ThiERz	Thiamine pyrophosphate-requiring enzyme
PhAT	Phospholipid biosynthesis acyltransferase	Tpter	Predicted membrane protein transporter
PM23	M23/M37 family protein.	TR	TonB-dependent siderophore receptor
PSS	Phosphatidylserine synthase		Transposase InsF for insertion sequence
Recom	Tyrosine recombinase	TranspF	IS3A/B/C/D/E/fA
RhD	Rhodanese domain protein	Transpl	ISxac3 transposase
RNAmT	RNA methyltransferase	TranspR	IS10R, transposase.
sAMS	S-adenosylmethionine synthetase	uCPB	Uncharacterized protein conserved in bacteria
SDR	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	uK	Unknown
SDR	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	UnPCB	Uncharacterized protein conserved in bacteria
SecB	Preprotein translocase subunit SecB,	ViuB	Vulnibactin utilization protein ViuB
SMR	SMR family protein	XCdA	Predicted xylanase/chitin deacetylase
SperBP	Spermidine/putrescine-binding protein	Xyll	Xylose isomerase domain protein TIM barrel
SR	Intracellular sulfur reduction protein	YigA	YigA-like protein
STP	Signal transduction protein	ZnH	Zn-dependent hydrolase
TaT	Transcriptional antiterminator	ZnM	Zinc metalloprotease
TetR	TetR regulatory protein	αG	Putative alpha-galactosidase
TG	Transglutaminase-like enzyme		5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate delta isomerase
		δI	

Tabla 9. Abreviaturas de los entornos de genes *qnr*- like cromosómicos

ANEXO 2. LISTA DE ARTÍCULOS PUBLICADOS Y MANUSCRITOS

Esta tesis doctoral está basada en trabajo no publicado y las siguientes publicaciones y manuscritos:

- I. "Structural Basis for the induction of the expression of the *S. maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF by the biocide triclosán". Hernández A., Martín-Ruiz, F., Romero A., Martínez J. L. En preparación.
- II. "Efflux pumps as an important mechanism of quinolone resistance". Vila J., Fàbrega A., Roca I., Hernández A., Martínez JL. **Advances in Enzymology**. En prensa.
- III. "*Stenotrophomonas maltophilia* drug resistance". Sánchez MB, Hernández A., Martínez JL. **Future Microbiol.** 2009 Aug;4:655-60.
- IV. "Structural and functional analysis of SmeT, the repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF". Hernández A., Maté M. J., Sánchez P., Romero A., Rojo F., Martínez J. L. **JBC**. 2009 May 22;284(21):14428-38.
- V. "Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in the microbial natural ecosystems". Martínez J. L., Sánchez B., Martínez-Solano L., Hernández A., Garméndia L., Fajardo A., Alvarez-Ortega, C. **FEMS Microbiol Rev.** 2009 Mar;33(2):430-49.
- VI. "A global view on antibiotic resistance" Martínez J. L., Garmendia L., Fajardo A., Hernández A., Linares J. F., Martínez L., Sánchez B. **FEMS Microbiol Rev.** 2009 Jan;33(1):44-65.
- VII. "Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants". Sánchez MB, Hernández A., Rodríguez-Martínez JM, Martínez-Martínez L, Martínez JL. **BMC Microbiol.** 2008 Sep 16;8:148.